

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchung des Einflusses  
mitochondrialer Polymorphismen  
auf die phänotypische Ausprägung  
der Neurofibromatose Typ 1 bei  
monozygoten Zwillingen**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Anne Katrin Detjen  
aus Köln

Gutachter:      1. Prof. Dr. M. Schülke, Berlin  
                     2. Priv.-Doz. Dr. Th. Rosenbaum, Düsseldorf  
                     3. Prof. Dr. med. A. Das, Hannover

Datum der Promotion:      18. November 2005

**Meinen Eltern  
Der kleinen Anne**

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei den Patienten und ihren Familien für die Bereitstellung der Proben und die Genehmigung zur Veröffentlichung der Fotos. Prof. Dr. Markus Schülke hat mich intensiv betreut, mir fachliche und methodische Hilfestellung gegeben und mich in die Welt der Molekulargenetik eingeführt. Dank an Frau Prof. Dr. Sigrid Tinschert für die Bereitstellung des Patientenmaterials und der nötigen Informationen sowie die inhaltliche Unterstützung. Angelika Zwirner hat mich im Labor tatkräftig unterstützt. Vielen Dank an Prof. Dr. S. Mundlos aus der Medizinischen Genetik für die Kooperation sowie Ingrid Barth, Gundula Leschik und Mohsen Karbasiyan für die Hilfe bei DNA-Präparation, Sequenzierung und Genotypisierung.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, Motivation und Unterstützung.



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Einführung .....	5
1.2	Neurofibromatose Typ 1 (von Recklinghausen) .....	5
1.2.1	Klinik .....	5
1.2.2	Genetik .....	6
1.3	Mitochondrien .....	9
1.3.1	Funktion .....	9
1.3.2	Mitochondriale DNA .....	10
1.3.3	Homoplasmie/Heteroplasmie .....	12
1.3.4	Mutationen und Polymorphismen der mitochondrialen DNA .....	13
1.3.5	Vererbung .....	14
1.4	Tumoren und mitochondriale Polymorphismen .....	16
1.5	Zielsetzung .....	18
<b>2</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>20</b>
2.1	Kasuistiken.....	20
2.1.1	Zwillingspaar A .....	20
2.1.2	Zwillingspaar B .....	21
2.1.3	Zwillingspaar C .....	21
2.1.4	Zwillingspaar D .....	22
2.2	Kontrolle .....	23
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1	Materialien .....	25
3.1.1	Oligonukleotide.....	25
3.1.2	Bakterienstämme.....	25
3.1.3	Chemikalien .....	25
3.1.4	Puffer, Lösungen, Medien .....	26
3.1.5	Geräte .....	27
3.1.6	Gebrauchswaren .....	27
3.1.7	Computer Software.....	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	DNA Extraktion.....	28
3.2.1.1	<i>DNA Extraktion aus EDTA-Blut</i> .....	28
3.2.1.2	<i>DNA Extraktion aus Tumorgewebe</i> .....	28
3.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	28
3.2.2.1	<i>Prinzip der PCR</i> .....	28
3.2.2.2	<i>Long-read PCR</i> .....	30
3.2.2.3	<i>PCR-Primer Design</i> .....	30
3.2.2.4	<i>Gelelektrophorese</i> .....	30
3.2.2.5	<i>Durchführung</i> .....	31
3.2.2.5.1	<u>Long read PCR</u> .....	31
3.2.2.5.2	<u>PCR</u> .....	32
3.2.2.5.3	<u>Gelelektrophorese</u> .....	33
3.2.3	DNA Sequenzierung .....	34
3.2.3.1	<i>Prinzip der Sequenzierung</i> .....	34
3.2.3.2	<i>Durchführung</i> .....	34
3.2.3.2.1	<u>Reinigung der PCR-Produkte</u> .....	34
3.2.3.2.2	<u>Sequenzierung</u> .....	35
3.2.3.2.3	<u>Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte</u> .....	38
3.2.3.2.4	<u>Gelelektrophorese am ABI Prism 3700</u> .....	38

3.2.3.2.5	Auswertung.....	38
3.2.3.3	Vergleich der Aminosäuresequenzen.....	39
3.2.4	Genotypisierung des D310-Traktes.....	39
3.2.4.1	Prinzip der Genotypisierung.....	39
3.2.4.2	Klonierung von PCR Produkten.....	39
3.2.4.2.1	Klonierungs-PCR.....	40
3.2.4.2.2	Klonierung.....	40
3.2.4.3	PCR mit fluoreszenzmarkiertem-Primer.....	41
3.2.4.4	Restriktion mit HaeIII.....	42
3.2.4.5	Genescan.....	42
3.2.4.5.1	Auswertung.....	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Sequenzierung des mitochondrialen Genoms.....</b>	<b>44</b>
4.1.1	Abweichungen von der Standardsequenz.....	44
4.1.2	Verteilung der Sequenzvarianten innerhalb des mitochondrialen Genoms .....	44
4.1.3	Vergleich der Sequenzvarianten mit der Datenbank Mitomap.....	45
4.1.4	Ergebnisse der einzelnen Patienten und der Kontrolle.....	45
4.1.4.1	Zwillingspaar A.....	46
4.1.4.2	Zwillingspaar B.....	47
4.1.4.3	Zwillingspaar C.....	49
4.1.4.4	Zwillingspaar D.....	50
4.1.4.5	Kontrolle.....	51
4.1.5	Überprüfung der Sequenzen mit Aminosäureaustausch auf ihre evolutionäre Konservierung.....	52
<b>4.2</b>	<b>Hypervariable Regionen - Mikrosatellitensequenzen .....</b>	<b>52</b>
4.2.1	HVR1 .....	52
4.2.2	HVR2.....	53
4.2.2.1	Zwillingspaar A und dessen Mutter M <sub>A</sub> .....	53
4.2.2.1.1	Vergleich der Genotypen in verschiedenen Tumoren von A <sub>1</sub> .....	55
4.2.2.2	Zwillingspaar B.....	56
4.2.2.3	Zwillingspaar C.....	56
4.2.2.4	Zwillingspaar D.....	57
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>5.1</b>	<b>Mitochondriale Polymorphismen und der unterschiedliche NF1-Phänotyp bei monozygoten Zwillingen.....</b>	<b>58</b>
<b>5.2</b>	<b>Homoplasmische Mutationen in Tumoren .....</b>	<b>59</b>
<b>5.3</b>	<b>Die HVR2 als Marker für klonales Wachstum.....</b>	<b>63</b>
<b>5.4</b>	<b>Die phänotypische Divergenz monozygoter Zwillinge mit NF1 – andere Aspekte und Ansätze.....</b>	<b>64</b>
5.4.1	Modifizierende Gene.....	64
5.4.2	Second hit – ein lokales Phänomen .....	65
5.4.3	Neurofibromin und Mitochondrien .....	66
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Aminosäuren</b>	
A=Ala	Alanin
C=Cys	Cystein
D=Asp	Asparaginsäure
E=Glu	Glutaminsäure
F=Phe	Phenylalanin
G=Gly	Glycin
H=His	Histidin
I=Ile	Isoleucin
K=Lys	Lysin
L=Leu	Leucin
M=Met	Methionin
N=Asn	Asparagin
P=Pro	Prolin
Q=Gln	Glutamin
R=Arg	Arginin
S=Ser	Serin
T=Thr	Threonin
V=Val	Valin
W=Trp	Tryptophan
Y=Tyr	Tyrosin
<b>Basen:</b>	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaar
CALF	Café-au-lait-Fleck
Co I-III	Cytochrom c Oxidase, Untereinheit I-III
CPEO	Chronisch progressive externe Ophthalmoplegie
CYB	Cytochrom B
ddNTP	Didesoxynukleotid
D-loop	Displacement loop
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid
GAP	GTPase aktivierendes Protein

HSP	Heavy Strand Promotor
HVR	Hypervariable Region
LHON	Leber'sche hereditäre Optikusneuropathie
LSP	Light Strand Promotor
mt	Mitochondrial
mtDNA	Mitochondriale DNA
ND1-6	NADH Dehydrogenase, Untereinheit 1-6
NF 1	Neurofibromatose Typ 1, von Recklinghausen
<i>NF1</i> -Gen	<i>Neurofibromin</i> -Gen
nt	Nucleotid
O <sub>H</sub>	Replikationsursprung des schweren Strangs
O <sub>L</sub>	Replikationsursprung des leichten Strangs
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
TFAM	Humaner mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Die Entstehung und das Wachstum von Tumoren sind Gegenstand zahlreicher wissenschaftlicher Untersuchungen. Man geht bei der Tumorgenese von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Die Methoden der modernen Molekularbiologie ermöglichen es, genetische Faktoren aufzudecken, die das Entstehen von Tumoren verursachen und/oder fördern. Des Weiteren sind epigenetische, stochastische und auch Umweltfaktoren für die Tumorgenese von Bedeutung.

Zahlreiche Publikationen der letzten Jahre legen einen Zusammenhang zwischen Tumorentstehung und Veränderungen der Mitochondrien nahe [Polyak et al. 1998, Fliss et al. 2000]. Die mitochondriale DNA (mtDNA), ihre vom nukleären Genom unabhängige Vererbung, ihre Veränderungen und ihr Einfluss auf die Mitochondrienfunktion stehen dabei im Mittelpunkt dieser Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit habe ich untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der mtDNA und der phänotypischen Ausprägung der Neurofibromatose Typ 1 (von Recklinghausen) besteht, die eine der häufigsten erblichen Tumorerkrankungen ist.

## 1.2 Neurofibromatose Typ 1 (von Recklinghausen)

Die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) wurde erstmals durch Friedrich von Recklinghausen (1882) beschrieben. Sie gehört zur Gruppe der Phakomatosen (neurokutane Syndrome) und ist mit einer Prävalenz von 1:5.000-1:2.000 eine häufige autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Hauptmerkmale der NF1 sind hyperpigmentierte Hautflecken (Café-au-lait Flecken) sowie Neurofibrome (benigne Hauttumore) und Schwannome (benigne Tumore der Markscheiden).

### 1.2.1 Klinik

Die Diagnose der Neurofibromatose Typ 1 basiert auf klinischen Kriterien, die auf einer Konsensuskonferenz des National Institute of Health (NIH) im Jahre 1988 festgelegt wurden.

Die Diagnose kann gestellt werden, wenn beim Patienten zwei oder mehr der folgenden Zeichen nachweisbar sind:

1. Sechs oder mehr Café-au-lait Flecken (CALF)
  - mit einem Durchmesser von > 5 mm vor der Pubertät
  - mit einem Durchmesser >15 mm nach der Pubertät.
2. Zwei oder mehr Neurofibrome irgendeines Typs oder ein plexiformes Neurofibrom.
3. Axilläres oder inguinales Freckling.

4. Ein Tumor im Verlauf der Sehbahn.
5. Zwei oder mehrere Lisch Knötchen (Irishamartome).
6. Eine Knochenläsion, z.B. die Verdünnung des Cortex eines langen Röhrenknochens (mit oder ohne Pseudoarthrose) oder die Dysplasie eines Keilbeinflügels.
7. Ein Verwandter ersten Grades mit nach oben genannten Kriterien diagnostizierter Neurofibromatose Typ 1.

Die Café-au-lait Flecken sind oft schon kurz nach der Geburt zu finden. Sie und einige andere Zeichen, wie Freckling oder Lisch Knötchen haben keine weitere klinische Bedeutung. Die Zahl der kutanen und subkutanen Neurofibrome, die bei fast allen erwachsenen Patienten vorhanden sind, variiert stark. Sie treten meist zu Beginn der Pubertät auf und vermehren sich mit zunehmendem Alter. In Phasen endokriner Umstellung, in der Adoleszenz und der Schwangerschaft, zeigen die Neurofibrome eine Wachstumstendenz und vermehren sich auch in ihrer Zahl [Friedmann et al. 1999].

Die plexiformen Neurofibrome, die bei ca. 15% der Patienten auftreten, können sich infiltrativ in umliegendes Gewebe ausbreiten und starke Schmerzen sowie Funktionsausfälle hervorrufen. Außerdem scheinen sie Ausgangspunkt für maligne Nervenscheidentumoren zu sein [Friedmann et al. 1997].

Tumoren der Sehbahn kommen bei ca. 20% der Kinder mit NF1 vor. In den meisten Fällen verursachen sie, im Gegensatz zu Optikusgliomen bei Patienten ohne NF1, keine klinischen Symptome [Listernick et al. 1997]. Sie können aber auch durch lokale Raumforderung zu Hirndrucksteigerung sowie neurologischen und endokrinen Ausfällen führen.

Patienten mit NF1 haben ein erhöhtes Risiko, Malignome zu entwickeln. Bestimmte Tumorformen, wie periphere Nervenscheidentumoren und Tumoren des zentralen Nervensystems, treten bei NF1 Patienten gehäuft auf. Seltener sieht man aber auch eine maligne Entartung von Zellen nicht neuralen Ursprungs, wie zum Beispiel myeloische Leukämien [Hope und Mulvihill 1981].

Des weiteren gibt es andere mit NF1 assoziierte Zeichen, wie Makrozephalie, Skoliose, Kleinwuchs, arterieller Hypertonus, Dysarthrie sowie signalintense Zonen im Bereich des Globus pallidus in der T2-Wichtung der kraniellen MRT. [Gutmann et al. 1997]. Die meisten NF1-Patienten haben eine normale Intelligenz. 30-60% haben jedoch Lernbehinderungen und Teilleistungsschwächen [North et al. 1997].

Für die signifikant erhöhte Morbidität und Letalität der Patienten mit NF1 scheinen vor allem Malignität (z.B. Neurofibrosarkome) und arterieller Hypertonus verantwortlich zu sein [Zöller et al. 1997].

### 1.2.2 Genetik

Die NF1 hat eine Penetranz von nahezu 100%. Allerdings variieren die Ausprägung und das Manifestationsalter der verschiedenen Symptome sehr

stark. Selbst eineiige Zwillinge können sich in der Verteilung und Ausprägung ihrer Symptome unterscheiden [Bauer et al. 1988].

Genetische Ursache der NF1 sind Mutationen im *Neurofibromin*-Gen (=NF1-Gen). Das NF1-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17. Es wurde 1990 durch die Bruchpunktanalyse unterschiedlicher auf Chromosom 17 liegender Chromosomentranslokationen bei zwei NF1-Patienten entdeckt. Mit Hilfe genetischer Marker wurde die genaue Lage der Bruchpunkte bestimmt. Aus den vier in Frage kommenden Kandidatengenen in der eingegrenzten Region konnte schließlich durch die Entdeckung weiterer Mutationen bei anderen NF1-Patienten das verantwortliche Gen identifiziert werden [Viscochil et al. 1990; Cawthon et al. 1990, Wallace et al. 1990, Upadhyaya 1990]. Das NF1-Gen erstreckt sich über 350 kbp und umfasst 60 Exons.

In etwa 50% der Fälle treten Neumutationen auf, die meisten davon liegen auf dem paternalen Chromosom [Stephens et al. 1992]. In der Datenbank des „NF1 Genetic Analysis Consortiums“ sind bisher über 500 verschiedene Mutationen dokumentiert (<http://www.nf.org/nf1gene/>). Die meisten Mutationen sind Deletionen und resultieren in trunkierten Proteinen. Nur ca. 10% führen zu Aminosäuresubstitutionen (missense Mutationen) [Rasmussen und Friedman 2000].

Es gibt für die Mutationen keine "hotspots"–sie sind mehr oder weniger mit gleicher Häufigkeit über das Gen verteilt. Die relativ am häufigsten auftretende Veränderung ist eine nonsense Mutation im Exon 31 (R1947X) und ist in 1-2% der Fälle nachweisbar [Dublin et al. 1995].

Das Genprodukt Neurofibromin kommt ubiquitär im Zytoplasma der Zellen vor. Etwa 20% koloalisiert mit Mitochondrien [Roudebush et al. 1997]. Am stärksten wird es im adulten zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert [Upadhyaya et al. 1998].

Eine Domäne des Neurofibromins, welche etwa 12% des Proteins umfasst, hat große Ähnlichkeit mit der Familie der ras-GAP Proteine [Xu et al. 1990]. Diese **G**TPase **A**ktivierenden **P**roteine (GAP) inaktivieren durch Steigerung der GTPase-Aktivität bestimmte G-Proteine wie zum Beispiel das ras-Protoonkogen. Durch Hydrolyse wird es von seiner aktiven, GTP-gebundenen Form in die inaktive, GDP-gebundene Form umgewandelt. Die ras-Onkogene spielen bei der Regulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle. Überschießende Aktivität der ras-Onkogene kann zu übermäßiger Proliferation und so zu Tumorwachstum führen. Die GAP wirken durch die Inaktivierung der ras-Onkogene als Tumorsuppressor.

Die große Bedeutung der GAP-Region für die Pathogenese der NF1 zeigten Klose et al. (1998). Sie untersuchten eine Mutation am Argininfinger, einem katalytischen Element der GAP-Region. Die Aminosäure Arginin an Position 1276 war hier durch Prolin ersetzt. Dies führte zu einer starken Reduktion der Hydrolyseaktivität der GTPase bei erhaltener Tertiärstruktur des Proteins und, im Gegensatz zu anderen häufigen Mutationen, normaler Neurofibromin-Synthese. Diese Untersuchungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass das komplexe Krankheitsbild der NF1 allein durch die Aktivitätsminderung des

Neurofibromins entstehen kann.

Neurofibromin und auch andere GAP können durch bestimmte Fettsäuren wie Arachidonsäure inhibiert werden [Golubic et al. 1991]. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen Neurofibromin und Membranen hin.

Die Kolokalisation zwischen Neurofibromin und Mitochondrien gibt Anlass zu der Vermutung, dass Neurofibromin mit Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran wie zum Beispiel Bcl-2, einem Effektorprotein der Apoptose, und einem weiteren GTP-bindenden Protein interagiert [Roudebush et al. 1997].

Die biologische Bedeutung der anderen Domänen des Neurofibromins ist ungeklärt. Riccardi (2000) wies auf die Bedeutung des *Neurofibromin*-Gens bei der Entwicklung von Dysplasien hin und stellte die Behauptung auf, das *Neurofibromin*-Gen sei generell ein Kontrollgen für das Wachstum von Geweben.

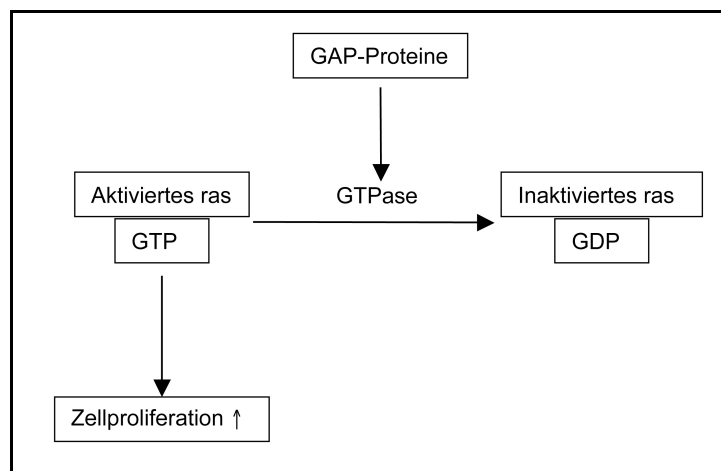


Abbildung 1: Inaktivierung der ras-Protoonkogene durch GAP-Proteine wie das Neurofibromin.

Ein wichtiger Faktor für die Entwicklung der NF1-assoziierten Neoplasien ist der Verlust oder die Inaktivierung des zweiten Allels des *NF1*-Gens. Gemäß der sogenannten „Second-hit Theorie“ kommt es zur Tumorentstehung, wenn zusätzlich zur Keimbahnmutation eine somatische Mutation das verbleibende Allel schädigt [Knudson 1971]. Im Falle der NF1 wird Neurofibromin durch Mutation oder Inaktivierung des zweiten Allels nicht mehr oder nicht ausreichend produziert. So fand man in benignen Neurofibromen gemischte Zellpopulationen, in denen einige Zellen einen second-hit aufwiesen und andere nicht. In Neurofibrosarkomen und malignen Schwannomen fand man eine klonale Zellproliferation. Neurofibromin war kaum nachweisbar, bei gleichzeitig stark erhöhten Spiegeln an aktiviertem p21ras [Basu et al. 1992, DeClue et al. 1992].

Die nichtneoplastischen Symptome der NF1 scheinen auf eine Haploinsuffizienz des Neurofibromins zurückzuführen zu sein [Krohne und Kehrer-Sawatzki 2001].



Eine eindeutige Genotyp-Phänotyp Relation für die *NF1*-Mutationen konnte bisher in keiner Studie festgestellt werden. Miller und Hall (1978) fanden heraus, dass mütterliche Transmission der *NF1* den Schweregrad der Krankheit erhöht. Bei der Ausprägung des Phänotyps scheinen aber noch andere Faktoren, wie weitere modifizierende Gene, Umwelt- und stochastische Faktoren eine Rolle zu spielen [Rasmussen 2000].

### 1.3 Mitochondrien

#### 1.3.1 Funktion

Mitochondrien sind Bestandteile des Zytoplasmas eukaryotischer Zellen. Sie sind elliptoide, ca. 2-4  $\mu\text{m}$  lange und 1  $\mu\text{m}$  breite, von einer Doppelmembran umgebene Strukturen. In ihrer Matrix sind spezifische Funktionen lokalisiert, wie zum Beispiel Teile der  $\beta$ -Oxidation, des Harnstoffzyklus und der Citratzyklus. An der inneren Mitochondrienmembran befinden sich die Enzymkomplexe der Atmungskette. Hier wird der größte Teil der Energie (ATP) des menschlichen Organismus durch oxidative Phosphorylierung gewonnen.

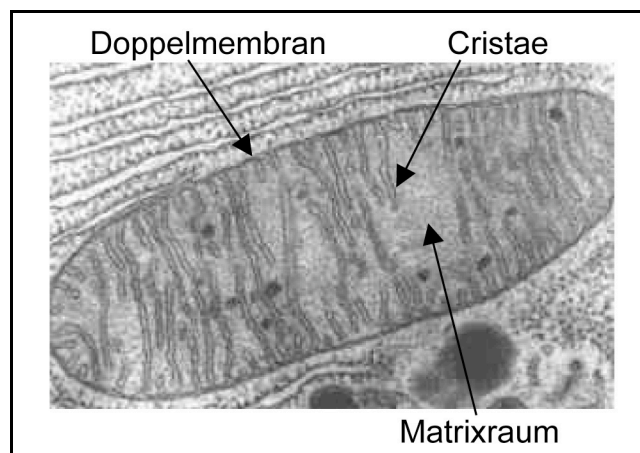


Abbildung 2: Elektronenmikroskopisches Bild des Mitochondriums einer Muskelzelle. Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran in den Matrixraum bilden die Cristae. Die Enzyme der Atmungskette befinden sich an der inneren Membran, die der  $\beta$ -Oxidation und des Citratzyklus im Matrixraum.

In ihrer „Endosymbionten-Theorie“ über die Entstehung der Eukaryonten vermutet Lynn Margulis (1975), dass sich die Mitochondrien im Laufe der Evolution aus unabhängig lebenden Protobakterien entwickelt haben. Entsprechend des damals auf der Erde herrschenden Milieus metabolisierten diese Protobakterien Wasserstoff und  $\text{CO}_2$ . Sie gingen eine Symbiose mit Organismen ein, die ihrerseits Wasserstoff und  $\text{CO}_2$  produzierten. Diese Symbiose persistierte im Verlauf der Evolution, passte sich den Veränderungen der Umweltbedingungen immer besser an und wurde zur „Endosymbiose“. Ein großer Teil der Gene des Proto-Mitochondriums wurde auf das nukleäre Genom der Wirtszelle übertragen, so dass das Funktionieren des

Mitochondriums nun eng an die Intaktheit der Gastzelle gebunden ist. Eine gewisse Unabhängigkeit haben sich die Mitochondrien bewahrt, indem sie sich unabhängig vom Zellzyklus vermehren können und über eine eigene zirkuläre DNA und einen eigenen Translationsapparat verfügen. Der Triplett-Code der mitochondrialen DNA (mtDNA) weicht leicht vom „universellen“ genetischen Code ab und die Mitochondrien besitzen 22 transfer-RNAs zur Translation der mtDNA-kodierten Gene.

### 1.3.2 Mitochondriale DNA

Entdeckt wurde die mitochondriale DNA (mtDNA) durch Nass und Nass (1963). Das Genom der Mitochondrien ist ein kreisförmiges, doppelsträngiges DNA-Molekül, das aus ca. 16569 Basenpaaren besteht. Die vollständige Sequenz wurde erstmals von Anderson et al. (1981) veröffentlicht. Inzwischen wurde sie mehrfach revidiert. Eine Konsensussequenz ist unter der GenBank-Zugriffsnummer NC\_001807 zugänglich.

Die Anzahl der Mitochondrien pro Zelle schwankt zwischen 10-500. Jedes Mitochondrium enthält drei bis sechs mtDNA Kopien. Einen Sonderstatus nehmen die Eizellen ein, welche bis zu 50.000 Mitochondrien enthalten können.

Das mitochondriale Genom des Menschen besteht zu 97% aus codierenden DNA-Sequenzen. 28 der insgesamt 37 Gene liegen auf dem schweren H-Strang (enthält prozentual mehr Guanin), 9 auf dem leichten L-Strang (enthält prozentual mehr Cytosin) (Abbildung 3). Sie kodieren für:

- 13 Polypeptide, die gemeinsam mit nukleär kodierten Proteinen die Komplexe I, III, IV und V der Atmungskette bilden
- 22 t-RNAs
- 2 rRNAs

Im Gegensatz zur nukleären DNA und der mtDNA der Hefebakterien ist die DNA der menschlichen Mitochondrien nicht in Introns und Exons unterteilt. Die Gene liegen dicht beieinander und die Gene für die ATPasen 6 und 8 überlappen sich sogar um 43 Basenpaare.

Eine 1121 bp lange, nicht-kodierende Region wird als displacement-loop (D-loop) bezeichnet. Der D-loop ist für die Regulierung von Transkription und Replikation der mtDNA zuständig. Seine Bedeutung zeigt sich auch darin, dass im D-loop drei in Wirbeltieren stark konservierte DNA-Sequenzen liegen (Conserved Sequence Blocks, CSB I-III). Darüber hinaus liegen im D-loop die beiden Promotoren für die Transkription des leichten (LSP=light strand promotor) und des schweren Stranges (HSP=heavy strand promotor). Hier befinden sich aber auch mehrere hypervariable Regionen (HVR1-3), welche den Mikrosatellitensequenzen der nukleären DNA entsprechen. Dies sind Mono- oder Dinukleotidrepeats, die häufig Längenvarianten aufweisen. Eine in der HVR2 liegende Mikrosatellitensequenz ist der D310-Trakt, ein Polycytosintrakt vor nt310. Längenvarianten mit sieben bis neun Cytosinresten sind in den Datenbanken eingetragen.

Die Transkription wird durch den nukleär kodierten mitochondrialen



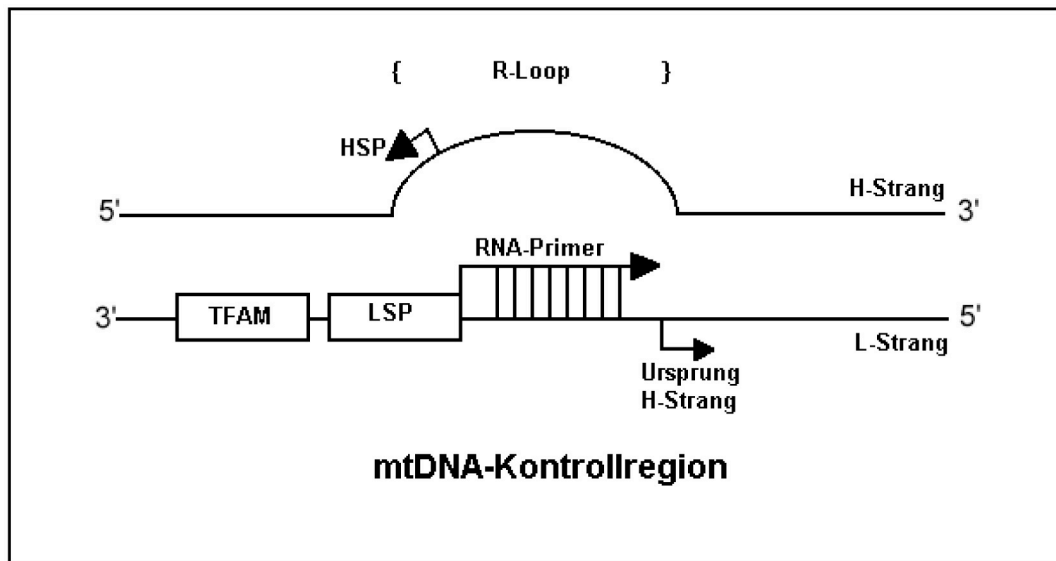


Abbildung 4: Klassisches Modell der mtDNA Replikation: mtDNA Kontrollregion und Initiation der H-Strang Synthese. Der nukleär kodierte TFAM bindet unmittelbar vor dem LSP im D-loop und sorgt für die Entspiralisierung der mtDNA. Ausgehend vom LSP synthetisiert die RNA-Polymerase ein Stück RNA. Der deplazierte H-Strang und das Hybrid aus RNA und L-Strang bilden den sogenannten R-loop. Die DNA-Polymerase benutzt die RNA als Primer und beginnt mit der Synthese eines neuen H-Stranges.

Zwei verschiedene Mechanismen, die scheinbar parallel nebeneinander ablaufen, spielen bei der Replikation der mtDNA eine Rolle: In dem "klassischen" Modell von Clayton (1982) wird zunächst, ausgehend vom  $O_H$ , der neue H-Strang synthetisiert (Abbildung 4). Wenn ca. 2/3 dieses Stranges synthetisiert sind, beginnt die Replikation des leichten Stranges am  $O_L$  in Gegenrichtung. Im Gegensatz dazu postulieren Bowmaker et al. (2003) eine bidirektionale doppelsträngige mtDNA-Synthese, ausgehend von verschiedenen Initiierungsstellen vor dem  $O_H$ . Der  $O_H$  sei nicht mehr Ursprung, sondern vielmehr Terminus der Replikation. In Zellen mit normalem Erhaltungsumsatz scheint die einzelsträngige, in Zellen mit reduzierter Anzahl von mtDNA-Kopien allerdings die doppelsträngige mtDNA Synthese zu überwiegen [Holt et al. 2000].

### 1.3.3 Homoplasmie/Heteroplasmie

Der größte Anteil der vielen in einem Individuum vorkommenden mtDNA-Kopien ist identisch. In diesem Fall spricht man von „Homoplasmie“. Treten verschiedene Genotypen nebeneinander auf, spricht man von „Heteroplasmie“. Der Grad der Heteroplasmie kann zwischen verschiedenen Geweben, zwischen verschiedenen Zellen eines Gewebes und innerhalb der Mitochondrien einer einzelnen Zelle variieren [Jansen 2000]. Monnat und Loeb (1985) stellten fest, dass Heteroplasmie in normalen Bevölkerungsgruppen sehr selten oder gar nicht vorkomme.

Heteroplasmie kann entweder von der Mutter über die Keimbahn vererbt oder

durch neue somatische Mutationen entstanden sein. Innerhalb einer einzelnen Zelle scheint generell die Tendenz zu bestehen, Homoplasmie zu erreichen [Nekhaeva et al. 2002a]. Entsteht eine neue Mutation, setzt sich entweder die mutierte- oder die Wildtyp-mt-DNA durch. Dies ist allerdings bei den meisten pathogenen mtDNA-Mutationen sowie den Mikrosatellitenregionen innerhalb des D-loops nicht der Fall. Der D310-Trakt, ein in der HVR2 liegender Polycytosintrakt, kommt bei vielen Personen in heteroplasmischer Form vor. Nekhaeva et al. (2002b) fanden sogar mehrere Längenvarianten des D310-Traktes innerhalb einzelner Zellen.

### 1.3.4 Mutationen und Polymorphismen der mitochondrialen DNA

Das mitochondriale Genom ist um ein Vielfaches anfälliger für Mutationen als das nukleäre [Habano et al. 1998]. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungen: Die durch die Atmungskettenfunktion im Mitochondrium in besonders hoher Konzentration vorkommenden reaktiven Sauerstoffradikale können die, im Gegensatz zur nukleären DNA nicht durch Histone geschützte, freiliegende mtDNA leicht angreifen [Oberley und Buettner 1979]. Außerdem scheint die mitochondriale  $\gamma$ -Polymerase bei der Replikation anfälliger für Fehler zu sein als die nukleäre DNA-Polymerase [Kunkel et al. 1981].

Im Alter nimmt die Zahl der Punktmutationen und Deletionen der mtDNA in allen Geweben zu. Die Ansammlung solcher Mutationen in postmitotischen somatischen Zellen scheint für die im Alterungsprozess auftretende Gewebeschwäche mitverantwortlich zu sein [Wallace et al. 1995].

Holt et al. (1988) beschrieben erstmals eine Deletion in der mtDNA als Ursache einer Erkrankung mit Myopathie und Herzrhythmusstörungen (Kearns-Sayre-Syndrom). Wallace et al. (1988) beschrieben im gleichen Jahr eine Punktmutation im *MTND4*-Gen als Ursache der Leber'schen hereditären Optikusneuropathie (LHON).

Die Auswirkungen pathogener Mutationen können teilweise dadurch kompensiert werden, dass in einer Zelle mehrere mtDNA-Kopien vorkommen. Erst wenn der Anteil der mutierten im Verhältnis zu nicht mutierten mtDNA-Kopien eine bestimmte Schwelle überschreitet, ist die Energieproduktion der Mitochondrien beeinträchtigt. Diese Schwelle kann in Abhängigkeit des betroffenen Gewebes vom oxidativen Stoffwechsel unterschiedlich hoch sein [Di Mauro et al. 2000]. Sie kann zum Beispiel überschritten werden, wenn im Laufe der Oogenese oder der frühen Embryogenese die Mitochondrien umverteilt werden und dann in einem ungünstigen Verhältnis (wildtyp versus mutiert) zueinander stehen.

Nicht alle im mitochondrialen Genom auftretenden Nukleotidvarianten müssen pathogen sein. Ein großer Teil verhält sich neutral und tritt als eine Variante zu anderen Genotypen auf. Man spricht dann von Polymorphismen. Zur Unterscheidung von Mutation und Polymorphismus formulierten DiMauro und Andreu (2000) vier „kanonische“ Kriterien.

Eine Mutation liegt dann vor, wenn:

1. der Nukleotidaustausch keinem in gesunden Personen vorbeschriebenen und daher als neutral bekanntem Polymorphismus entspricht.
2. der Nukleotidaustausch an einer
  - in der Evolution konservierten und
  - funktionell wichtigen
 Stelle liegt.
3. Pathogene Mutationen sind bis auf wenige Ausnahmen heteroplasmisch.
4. Der Grad der Heteroplasmie bei verschiedenen Familienmitgliedern sollte in grobem Zusammenhang mit der Ausprägung der Symptome stehen (Genotyp-Phänotyp-Relation).

Pathogene mtDNA-Mutationen führen meist zu Multisystemerkrankungen, da die Mitochondrien ubiquitär in allen Geweben vorkommen. Die meisten der Mutationen koexistieren neben der Wildtyp-mtDNA. Eine besonders hohe Mutationslast findet man in postmitotischen Geweben wie im Skelettmuskel, Herz und zentralem Nervensystem (ZNS). Daher treten besonders häufig muskuläre, kardiale und neurologische Symptome auf. Unterschiede im klinischen Bild hängen stark davon ab, welcher Teil der mtDNA von einer Mutation betroffen ist (z.B. t-RNA, Protein-kodierende Gene).

Die gleiche Mutation kann aber auch zu verschiedenen Krankheitsbildern oder unterschiedlichen Schweregraden der Symptome führen (Pleiotropie). Dies kann durch eine unterschiedliche Verteilung der mutierten mtDNA in die verschiedenen Gewebe (Gewebsheteroplasmie), durch das Verhältnis von mutierter zu nicht-mutierter DNA oder auch durch nukleäre Einflüsse verursacht sein [Kirches et al. 2001a]. So bestehen zum Beispiel die einzelnen Komplexe der Atmungskette aus nukleär und mitochondrial kodierten Proteinen, die miteinander interagieren. Bei betroffenen Personen vorkommende, per se nicht pathogene Isoformen nukleär kodierter Proteine könnten in Kombination mit einer mitochondrialen Mutation die Ausprägung der Erkrankung verstärken [Carelli et al. 2003].

Manchmal ist auch nur ein einziges Organ betroffen. In diesem Fall könnte es sich um eine somatische Mutation handeln, die erst während der Embryogenese, nach der Differenzierung in die drei Keimblätter stattgefunden hat. Dies nennt man somatisches Mosaik.

### 1.3.5 Vererbung

Mitochondrien werden asexuell, rein maternal vererbt. Im Halsbereich der Spermien sind ebenfalls Mitochondrien enthalten. Sie liefern die für die Motilität der Spermien nötige Energie. Dabei entstehende Sauerstoffradikale schädigen die Mitochondrien. Da nur der Spermienkopf in die Oozyte eindringt, werden die

väterlichen Chromosomen – mit nur wenigen Ausnahmen - nicht auf die Nachkommen übertragen [Cummins et al. 2000, Schwartz und Vissing 2002].

Die Mitochondrien sind als genetisches System besonders anfällig für Mutationen. Dennoch ist das mitochondriale Genom seit Millionen Jahren in größten Teilen konserviert. Auf der anderen Seite können neue Nukleotidvarianten des mitochondrialen Genoms in sehr kurzer Zeit fixiert werden [Hauswirth und Laipis 1982]. Dies bedeutet, dass ein heteroplasmisch auftretender Polymorphismus innerhalb weniger Generationen homoplasmisch werden kann. Der Wechsel von einer Sequenzvariante zu einer anderen kann sogar von einer Generation auf die nächste stattfinden [Koehler et al. 1991].

Als Erklärung für diese Phänomene nimmt man an, dass es zu einem Zeitpunkt in der Keimzellentwicklung einen Engpass oder "bottleneck" geben muss, der nur eine geringe Zahl mitochondrialer Einheiten zur Weitervererbung zulässt. Zu diesem Engpass kommt es dadurch, dass die Zahl der mtDNA Moleküle pro Mitochondrium in einem Stadium der Oogenese auf 1-2 reduziert wird. Die reife Oozyte enthält ca. 50-100.000 Mitochondrien (Abbildung 5). Nach der Befruchtung werden diese Mitochondrien während der ersten mitotischen Teilungen auf die Tochterzellen verteilt. Die Replikation der mtDNA beginnt erst wieder im Morulastadium [Howell 2000a].

Jenuth et al. (1996) haben in Untersuchungen an heteroplasmischen Mäusen festgestellt, dass eine zufällige Verteilung der mtDNA-Varianten während der mitotischen Teilung der Oogonien, also vor der Differenzierung der primären Oozyten stattfinden muss. Sie gehen davon aus, dass die Anzahl der segregierenden Einheiten ca. 200 beträgt.

Die Frage, ob die Genotypen, die an die nächste Generation vererbt werden, zufällig ausgewählt werden, oder ob es eine Art „Funktionsprüfung“ der Mitochondrien gibt, ist noch ungeklärt. Es gibt mathematische Modelle, die eine Fixierung von Mutationen durch reine Zufallsverteilung im Sinne des von Jenuth aufgestellten Verteilungsmusters in Frage stellen. Schülke et al. (1998) fanden in einer Familie eine Zunahme des Heteroplasmiegrades einer tRNA-Mutation zwischen zwei Generationen von 4 auf 100%. Diese Zunahme lässt sich unter der Annahme eines „bottleneck“ von 200 Einheiten und einer Zufallsverteilung nicht erklären. Eine schnelle Fixierung von Mutationen innerhalb einer Generation könnte durch weitere Phänomene wie Clusterverhalten von Mitochondrien, positive Selektion und Replikationsvorteile der mutierten mtDNA erklärt werden [Yoneda et al. 1992].

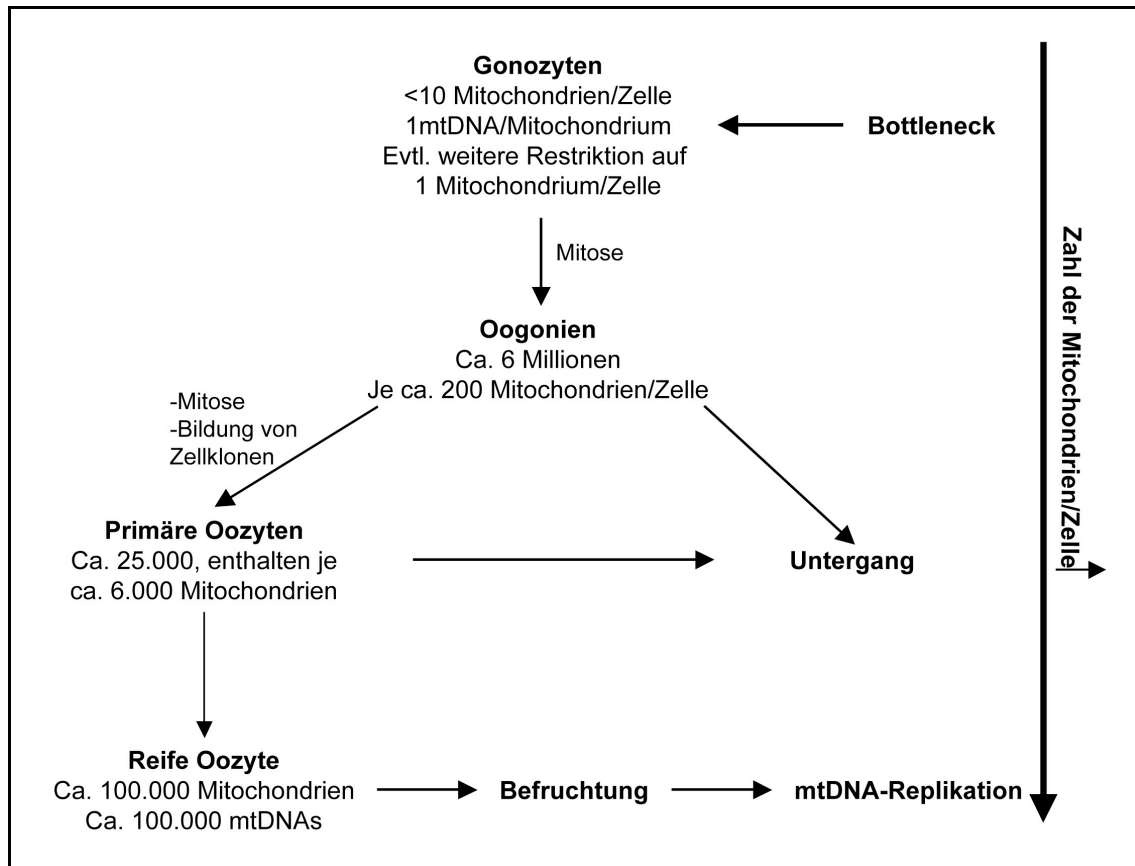


Abbildung 5: Mitochondriales „bottleneck“: Die geringste Anzahl der Mitochondrien und mtDNAs, und damit der Flaschenhals, liegt im Stadium der primordialen Keimzellen (Gonocyten) vor [Jansen und De Boer 1998]. Danach nimmt die Zahl der Mitochondrien/Zelle stetig zu und liegt im Stadium der sprungreifen Oozyte bei 50-100.000. Während der gesamten Zeit scheint die Zahl der mtDNA-Kopien/Mitochondrium bei eins zu liegen. Die mtDNA-Replikation und Mitochondrienteilung sistiert in der befruchteten Oozyte bis zum Morulastadium.

#### 1.4 Tumoren und mitochondriale Polymorphismen

Die Forschung zur Entstehung von Tumoren konzentriert sich stark auf genetische Veränderungen, die zur Aktivierung von Onkogenen, zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und zu Defekten des mismatch-repair Systems führen können.

In den letzten Jahren wurde vermehrt von somatischen Mutationen der mtDNA in den Zellen verschiedener Tumoren berichtet. Man fand zum Beispiel Deletionen und Punktmutationen der mtDNA in kolorektalen Tumoren [Polyak et al. 1998], Magen- [Burgart et al. 1995], Nierenzell- [Horton et al. 2000], Lungen- und Blasenkarzinomen [Fliss et al. 2000]. Meist sind die beschriebenen Veränderungen homoplasmische Nukleotidsubstitutionen, von denen die meisten bereits als Polymorphismen bekannte sind [Kirches et al. 2001b].

Am besten untersucht ist der D-loop und die in ihm liegenden hypervariablen



Regionen, die als hotspots für Mutationen maligner Tumoren gelten [Fliss et al. 2000].

Gegenstand der Diskussion ist, ob diese Mutationen zufällig entstanden und eine Folge klonalen Wachstums von Tumoren sind oder ob sie selektive Vorteile gegenüber dem Wildtypgenom besitzen. Es ist ungeklärt, ob sie das Entstehen und das Wachstum von Tumoren fördern oder sich neutral verhalten. Daraus ergibt sich die Frage, ob man diese Mutationen als Marker für klonales Wachstum verwenden kann.

Coller et al. (2001) entwickelten ein ComputermodeLL mit dem sie zeigten, dass Homoplasmie von somatischen Mutationen allein durch zufällige Replikation nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen entstehen kann. Die Zellteilungsrate in Tumovorläuferzellen ist bis zu dreifach höher als in normalem Gewebe. Dadurch könnte die Entstehung von Homoplasmie beschleunigt werden. Dennoch sind homoplasmische mtDNA-Mutationen kein tumorspezifisches Phänomen. Sie sind, allerdings seltener, auch in gesundem Gewebe zu finden.

Gleichzeitig werden aber auch Selektionsmechanismen diskutiert, die sich vor- oder nachteilig auf die Ausbreitung von Mutationen auswirken können. Chen et al. (2003) postulieren, dass die Mutationen in Tumoren nicht rein zufällig entstanden sein können, da die Mutationsfrequenz in Tumoren höher sei als man nach 300 bis 600 Teilungszyklen erwarten würde. Polyak et al. (1998) untersuchten Kolonkarzinome und fanden in 70% homoplasmische somatische Mutationen. Sie leiteten aus dieser Feststellung ab, dass das mutierte mitochondriale Genom einen Replikationsvorteil gegenüber dem Wildtyp-Genom hätte. Attardi et al. (1995) konnten zeigen, dass Signale von funktionsdefizienten Mitochondrien als eine Art Kompensationsmechanismus deren Überreplikation stimulierten. Jenuth et al (1997) konnten eine organspezifische Selektion für bzw. gegen neutrale mitochondriale Genotypen nachweisen.

Klonales Wachstum von Tumorzellen kann zur schnellen Ausbreitung von Mutationen innerhalb von Tumoren führen. Die Idee der klonalen Expansion mutierter DNA Moleküle stammt von Albertini aus den siebziger Jahren aus Versuchen mit mutierten T-Zellen [Übersichtsartikel Albertini (2001)]. Man geht davon aus, dass Mutationsfraktionen in Clustern liegen, entstanden durch klonales Wachstum ausgehend von einer einzigen Mutante. Innerhalb eines Mitochondriums liegen die mitochondrialen Genome in Clustern, die perinukleär liegenden werden bevorzugt repliziert [Davis und Clayton 1996]. Ein solches Cluster kann sich expansiv auf eine ganze Zelle und in der Folge auf ein Organ oder einen ganzen Organismus ausbreiten, je nachdem wie früh und in welcher Zelle die Mutation entstanden ist.

Die funktionelle Bedeutung der in Tumoren gefundenen Mutationen ist ungeklärt. Taylor et al. (2003) fanden somatische Mutationen der mtDNA in Kolon-Stammzellen, was auf das Vorhandensein solcher Mutationen bereits vor der Tumorentstehung hinweist. Diese zufällig entstandenen Mutationen könnten, wenn sie sich ausbreiten, bereits durch geringe Veränderungen der Mitochondrienfunktion (zum Beispiel des Energiestoffwechsels, der ATP-

Produktion und der Apoptosemechanismen) begünstigend auf die Tumorentstehung wirken. Polyak et al. (1998) postulieren hingegen, die Mutationen, die sie in Kolonkarzinomen fanden, seien erst während der Tumorigenese entstanden.

Jones et al. (2001) empfehlen, die homoplasmischen Mutationen in Tumoren als diagnostische Marker zu nutzen. Klonales Wachstum könnte etwa durch Untersuchung des D310-Traktes als Marker festgestellt werden [Ha et al. 2002]. Der in der HVR2 gelegene D310-Trakt, kommt bei vielen Individuen in heteroplasmischer Form mit mehreren Längensvarianten vor. Trotz seiner Nähe zur mitochondrialen Replikationsmaschinerie scheinen die verschiedenen Varianten keinen Einfluss auf die Replikation zu haben. In Tumoren wurde eine Tendenz dieser Region zu Homoplasmie nachgewiesen [Liu et al. 2003].

## 1.5 Zielsetzung

Monozygote Zwillinge verfügen über identische nukleäre DNA Kopien. Dies bedingt ihre große phänotypische Ähnlichkeit. Dennoch können sich monozygote Zwillinge in ihrem Phänotyp erheblich voneinander unterscheiden. Da beide Zwillinge in ihrem nukleären Genom identische Chromosomen aufweisen und somit über die gleiche Erbinformation verfügen, müssen diese phänotypischen Unterschiede durch andere Faktoren bedingt sein. Einer dieser Faktoren sind Umwelteinflüsse. Andere Faktoren umfassen sekundäre Genmodifikationen (z.B. Imprinting) und Gene, die nicht durch die Chromosomen vererbt werden.

Die Mitochondrien mit ihrem Genom und den darin enthaltenen Polymorphismen werden im Morulastadium nicht immer gleichmäßig auf beide Embryonen verteilt. Ungleich verteilte Polymorphismen in mtDNA-kodierten Genen könnten daher den Phänotyp monozygoter Zwillinge bei einer Multisystemerkrankung, wie hier der Neurofibromatose Typ 1, in unterschiedliche Richtungen modifizieren.

Da mtDNA-Varianten auch bei der Tumorigenese eine Rolle zu spielen scheinen, wollte ich herausfinden, ob diese die Ursache für den Unterschied monozygoter Zwillinge mit NF1 bezüglich ihrer Tumorerkrankung und anderer phänotypischer Auffälligkeiten sein könnten.

Hierfür habe ich das mitochondriale Genom vier monozygoter, an Neurofibromatose Typ 1 erkrankter Zwillingspaare vollständig sequenziert und analysiert. Polymorphismen, die sich zwischen den Zwillingen unterschieden, sollten mit der phänotypischen Ausprägung ihrer Erkrankung korreliert werden.

Des Weiteren habe ich die intraindividuelle Verteilung von Polymorphismen bei einem Zwillingspaar untersucht und dabei nach Unterschieden zwischen mtDNA aus Blut- und Tumorgewebe gesucht. Die Frage war, ob ich in Neurofibromen somatische mtDNA-Mutationen nachweisen kann und ob diese unter Umständen einen Einfluss auf das Entstehen der Tumore haben könnten.

Da in vorhergehenden Publikationen der D310-Trakt als Marker für klonales Tumorstadium empfohlen wurde, wollte ich durch den Vergleich der

Längenvarianten des D310-Traktes zwischen einem Zwillingsspaar und seiner Mutter sowie verschiedener Tumore eines Patienten feststellen, ob es in Neurofibromen die in anderen Tumoren nachgewiesene Tendenz dieser Region zur Homoplasomie als Zeichen klonalen Wachstums gibt.

## 2 Patienten

Ich habe vier monozygote Zwillingspaare mit Neurofibromatose Typ 1 untersucht. Bei allen Patienten ist eine Mutation im *NF1*-Gen bekannt und die Monozygotie war durch DNA-Fingerprinting bestätigt worden. Die Paare untereinander unterscheiden sich hinsichtlich der Art ihrer Mutation, ihres Alters und der Ausprägung der Krankheitsmerkmale.

Zwischen den Zwillingen eines Paares finden sich deutliche Unterschiede im Phänotyp. Diese bestehen im Aussehen, in der Zahl der Neurofibrome und Café-au-lait Flecken sowie weiterer Krankheitsmerkmale (siehe Tabellen 1-4 und die Photographien der Patienten).

### 2.1 Kasuistiken

#### 2.1.1 Zwillingspaar A

Die weiblichen Zwillinge A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> wurden 1982 in Deutschland geboren. Sie sind gemeinsam aufgewachsen. Die klinischen Daten wurden in den Jahren 2000 und 2001 erhoben, als die Mädchen 18 bzw. 19 Jahre alt waren. Phänotypisch unterscheiden sie sich in Größe, Gewicht und in der Ausprägung der NF1-Symptome (Tabelle 1).

Bei Zwilling A<sub>1</sub> wurde 1988 ein Optikusgliom Grad I diagnostiziert, das 1988 operativ entfernt wurde. 1993 wurde eine Rezidivoperation durchgeführt. Als Folge des Optikusglioms entwickelte sie eine vollständige Optikusatrophy beidseits. Ein postoperativer Hydrozephalus internus wird seit 1988 mit einem ventrikulo-atrialen Shunt drainiert. Als Folge der Operation entwickelte sich eine hypothalamische Störung und das Mädchen leidet an einer Adipositas (BMI 31,9). Der endokrinologische Befund ist bis auf ein leicht erhöhtes Prolaktin normal. Zwilling A<sub>2</sub> hat am rechten Oberschenkel zwei plexiforme Neurofibrome (10x8 cm und 7x8 cm), die bei längerem Laufen manchmal schmerzen. Sie leidet zusätzlich an einer linkskonvexen Skoliose in Höhe BWK9.

Bei A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> wurde eine Deletion von zwei Basenpaaren c.1541-1542delAG im Exon 10a des *NF1*-Gens festgestellt, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und zu einem präterminalen Stopcodon führt.

Die Mutter der beiden (M<sub>A</sub>), geboren 1954, hat einen Café-au-lait-Fleck und ansonsten keine weiteren Symptome einer NF1.

	<b>A</b> <b>*1982, weiblich</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Mutation</b>	c.1541-1542delAG	
<b>Größe</b>	1,59m	1,66m
<b>Gewicht</b>	80,7kg	59,5kg
<b>Kopfumfang</b>	57cm	55cm
<b>BMI</b>	31,9	21,6
<b>Zahl der Neurofibrome</b>	~60 kleine intrakutane	~50 kleine intrakutane 2 plexiforme
<b>Zahl der CALF</b>	17>1,5cm, zahlr. kleine, axilläres Freckling	17>1,5cm, zahlr. kleine, axilläres Freckling
<b>Diskordanz für weitere Merkmale</b>	Optikusgliom Hydrozeph. internus	Skoliose

Tabelle 1: Zwillinge A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. Klinische Daten aus dem Jahr 2001.

### 2.1.2 Zwillingsspaar B

Die männlichen Zwillinge B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>, geboren 1980, stammen aus dem ehemaligen Jugoslawien. Die NF1 wurde bei ihnen 1998, im Alter von 18 Jahren diagnostiziert. Aus diesem Jahr stammen auch die klinischen Daten (Tabelle 2, Abbildung 7). Zwilling B<sub>1</sub> leidet unter einer schweren Skoliose, die 1998 operativ korrigiert wurde.

In der Mutationsanalyse fand man eine Deletion von vier Basenpaaren (c.499-503delTGTT) des *NF1*-Gens.

	<b>B</b> <b>*1980, männlich</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Mutation</b>	c.499-503delTGTT	
<b>Größe</b>	1,73m	1,83m
<b>Gewicht</b>	47kg	78kg
<b>Kopfumfang</b>	57cm	60,5cm
<b>BMI</b>	15,7	23,3
<b>Zahl der Neurofibrome</b>	10	12 1 plexiformes
<b>Zahl der CALF</b>	26	18
<b>Diskordanz für weitere Merkmale</b>	Skoliose	

Tabelle 2: Zwillinge B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. Klinische Daten aus dem Jahr 1998.

### 2.1.3 Zwillingsspaar C

Bei den aus Deutschland stammenden Zwillingen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> wurde die NF1 im Jahre 1994 im Alter von 33 Jahren diagnostiziert. In diesem Jahr wurden auch

die klinischen Daten erhoben (Tabelle 3). Bei den beiden Frauen variiert die Zahl der Neurofibrome und CALF stark.

Als Mutation im *NF1*-Gen fand man einen Basenaustausch (c.4839T>G).

	<b>C</b> <b>*1961, weiblich</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Mutation</b>	c.4839 T>G	
<b>Größe</b>	1,60m	1,52m
<b>Gewicht</b>	54kg	70kg
<b>Kopfumfang</b>	58cm	64,5cm
<b>BMI</b>	21,1	30,3
<b>Zahl der Neurofibrome</b>	10	55
<b>Zahl der CALF</b>	14	5
<b>Diskordanz für weitere Merkmale</b>	Hypothyreose	plexiformes Neurofibrom Hydrozeph. internus Vitiligo

Tabelle 3: Zwillinge C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>. Klinische Daten aus dem Jahr 1994.

#### 2.1.4 Zwillingspaar D

Die weiblichen Zwillinge D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> wurden 1986 in Deutschland geboren. Die klinischen Befunde stammen aus den Jahren 1994 und 1996, als die beiden acht bzw. zehn Jahre alt waren (Tabelle 4, Abbildung 8).

	<b>D</b> <b>*1986, weiblich</b>	
	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Mutation</b>	c.3737-3740delTGTT	
<b>Größe</b>	1,22m	1,22m
<b>Gewicht</b>	27kg	24kg
<b>BMI</b>	18,1	16,1
<b>Zahl der Neurofibrome</b>	7 kleine	5 kleine 1 plexiformes
<b>Zahl der CALF</b>	12	11
<b>Diskordanz für weitere Merkmale</b>	Optikusgliom	Skoliose

Tabelle 4: Zwillinge D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub>. Auflistung der Krankheitsmerkmale aus dem Jahr 1996.

Bei Zwilling D<sub>1</sub> wurde 1990 ein Optikusgliom operativ entfernt. Bei den beiden fand man eine Deletion von vier Basenpaaren im *NF1*-Gen (c.3737-3740delTGTT).

## 2.2 Kontrolle

Als Kontrolle wurde aus Blutleukozyten gewonnene mtDNA einer 47 jährigen gesunden Frau verwendet

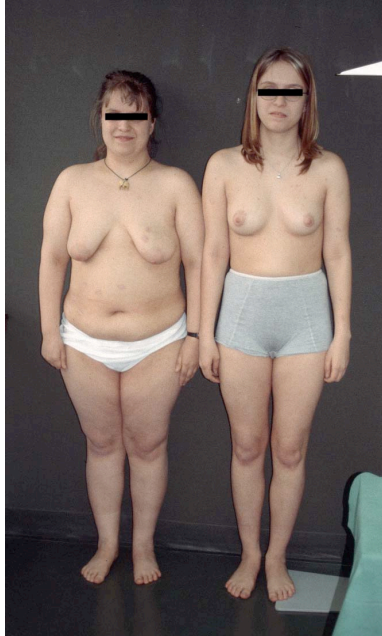


Abbildung 6: Zwillinge A<sub>1</sub> (links) und A<sub>2</sub> (rechts)



Abbildung 7: Zwillinge D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub>.



Abbildung 8: Zwillinge B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. Zwilling B<sub>2</sub>: Plexiformes Neurofibrom der linken Schulter



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotid-PCR-Primer habe ich bei Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland synthetisieren lassen.

##### 3.1.2 Bakterienstämme

Produkt	Hersteller
E.coli JM109	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

##### 3.1.3 Chemikalien

Produkt	Hersteller
□HindIII	Sigma, St. Louis, CA, USA
1000bp-DNA-ladder	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
100bp-DNA-ladder	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Agarose	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
Alkalische Phosphatase	usb, Bad Homburg, Deutschland
Blue Dextran	Perkin Elmer, Foster City, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	Roche, Basel, Schweiz
Chlorform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Deionisiertes H <sub>2</sub> O	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
Ethylalkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Exonuklease I	usb, Bad Homburg, Deutschland
Formamid	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland
GeneScan 500-ROX	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
HaeIII	New England Bio Labs, Beverly, MA, USA
IPTG	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland

LA PCR Kit V.2.1	TaKaRa, Kyoto, Japan
LB AGAR	Sigma, St. Louis, CA, USA
LB Medium	Sigma, St. Louis, CA, USA
Na <sub>2</sub> EDTA(TitriplexIII)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol	Invitrogen, Renfrewshire, Großbritannien
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deutschland
pGEM-T Cloning Kit	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
QIAquick™ Gel Extraction Kit	QIAgen Inc., Chatsworth, CA, USA
ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SDS Sodium-Dodecylsulfat 10%	Sigma, St. Louis, CA, USA
Sephadex™ G-50	Amersham, Uppsala, Schweden
SOC-Medium	Sigma, St. Louis, CA, USA
Taq-Polymerase, Puffer, MgCl	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Tris Base, Tris[hydroxymethyl]amino-methan)	Sigma, St. Louis, CA, USA
X-Gal	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.4 Puffer, Lösungen, Medien

#### **10x TBE-Puffer** pH 8,3

Tris	1 M
Borsäure	1 M
Na <sub>2</sub> EDTA	20 mM

#### **SE-Puffer** pH 8,0; autoklaviert

NaCl	75 mM
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	25mM

#### **Lysepuffer** pH 7,4; autoklaviert

NH <sub>4</sub> Cl	155 mM
KHCO <sub>3</sub>	10 mM
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	0,1 mM

#### **Puffer A**

NaCl	0,1 M
Tris Base	0,05 M
EDTA	5 mM

#### **1\*TE Puffer** pH 8,0; autoklaviert

Tris Hcl	10 mM
EDTA	1mM

#### **Agarosegel 0,7%**

1xTBE Puffer	100 ml
Agarose	0,7 g
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	10 µl

### 3.1.5 Geräte

Sequencer: ABI Prism 3700 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Thermocycler: Primus 96plus	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Kamera:	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge: Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 3.1.6 Gebrauchswaren

Falcon Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
PCR-Tubes und Caps	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 und 1ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Standardtips (10, 100 und 1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

### 3.1.7 Computer Software

Amplify Version 1.2□	Bill Engels, University of Wisconsin, USA <a href="http://www.engels.genetics.wisc.edu">www.engels.genetics.wisc.edu</a>
DNaid 1.8	by Frédéric Dardel Laboratoire de Biochimie École Polytechnique 91128 Palaiseau Cedex, France <a href="http://www.geneticengineering.org/software/dnaid.html">www.geneticengineering.org/software/dnaid.html</a>
GeneScan	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Primers! for the Mac	Resnick, Richard Primer v.1.0. Ashland, MA, 1996 <a href="http://www.iubio.bio.indiana.edu.7780/archive/00000092">www.iubio.bio.indiana.edu.7780/archive/00000092</a>
Sequence Navigator Version 1.0.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 DNA Extraktion

#### 3.2.1.1 DNA Extraktion aus EDTA-Blut

Zur Gewinnung der mitochondrialen DNA aus Blutleukozyten wird EDTA Blut mit 30 ml Lysepuffer (4°C) versetzt und 15 Minuten auf Eis geschwenkt. Dies führt zur Zerstörung der Erythrozyten, während Leukozyten und DNA erhalten bleiben. Dann habe ich bei 670 g zentrifugiert, den Überstand dekantiert und noch einmal Lysepuffer hinzugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren habe ich das entstandene Pellet mit 5 ml SE Puffer resuspendiert, 50 ml Proteinase K hinzugegeben, welche denaturierte Proteine abbaut, und geschüttelt. Dann wird als Detergens 250  $\mu$ l 20% SDS hinzugegeben und bei 55°C über Nacht inkubiert. Anschließend werden nochmals 5 ml SE Puffer beigelegt, weitere 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Dann kommen 3 ml 6M NaCl hinzu und nach 15-minütigem Zentrifugieren bei 1509 g kann man den klaren Überstand in ein Falcon Röhrchen überführen. Die Beigabe zweier Volumenteile absoluten Alkohols führt zur Fällung der DNA, die man mit einer Glaspipette in ein Reaktionsgefäß überführen kann. Als letzten Schritt habe ich 70% Ethanol beigegeben, das Salze auswäscht und die Proteinase K entfernt, während die DNA in Fällung bleibt. Das Ethanol wird nach erneutem Zentrifugieren mit einer ausgezogenen Glaspipette abgesaugt, das DNA-Pellet kann nach dem Trocknen mit 1\*TE-Puffer auf eine Konzentration von 200 ng DNA/ $\mu$ l eingestellt werden.

#### 3.2.1.2 DNA Extraktion aus Tumorgewebe

40 bis 50 mg des bei -80°C gefrorenen Gewebes werden zerkleinert, 400  $\mu$ l Puffer A, 40  $\mu$ l 10% SDS und 40  $\mu$ l Proteinase K hinzugegeben und bei 37°C über 24 Stunden inkubiert. Wenn sich das Gewebe aufgelöst hat, gibt man 480  $\mu$ l Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 hinzu und zentrifugiert bei 15.700 g. Danach befindet sich die DNA im Überstand, den man vorsichtig abnimmt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann fügt man die gleiche Menge Chloroform hinzu, zentrifugiert noch einmal bei 15.700 g und nimmt den Überstand genau ab. Es kommen 0,1 Volumenanteile Na-Acetat sowie 3 Volumenanteile Isopropanol hinzu. Wieder wird abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und dann mit 70% Ethanol gewaschen. Schließlich erhält man ein Pellet, das in 1\*TE gelöst und auf eine Konzentration von 200 ng DNA/ $\mu$ l eingestellt wird.

### 3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 3.2.2.1 Prinzip der PCR

Die Methode der PCR wurde im Jahre 1985 durch Kary Mullis entwickelt [Mullis und Faloona 1987]. Durch dieses Verfahren wurde es möglich, bestimmte DNA Sequenzen gezielt zu vervielfältigen.

Eine aus Bakterien (z.B. *Thermophilus aquaticus* oder *Pyrococcus furiosus*) gewonnene, thermostabile DNA-Polymerase benutzt kurze Oligonukleotidprimer als Ausgangspunkt der DNA-Synthese. Sie verlängert, in Gegenwart von Desoxynukleotiden (dNTPs) und unter den richtigen Temperaturbedingungen (gewöhnlich 72°C), den Strang entlang der Ausgangsmatrize (template) in 3'-Richtung. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren. Ab dem dritten PCR-Zyklus entstehen Produkte, die der Länge der Zielsequenz zwischen den beiden Primern entsprechen und mit jedem weiteren Zyklus steigt die Menge der Ziel-Kopien exponentiell. Unter idealen Bedingungen sollte sich die Zielsequenz nach 20 Zyklen  $2^{20}$ -fach vermehrt haben.

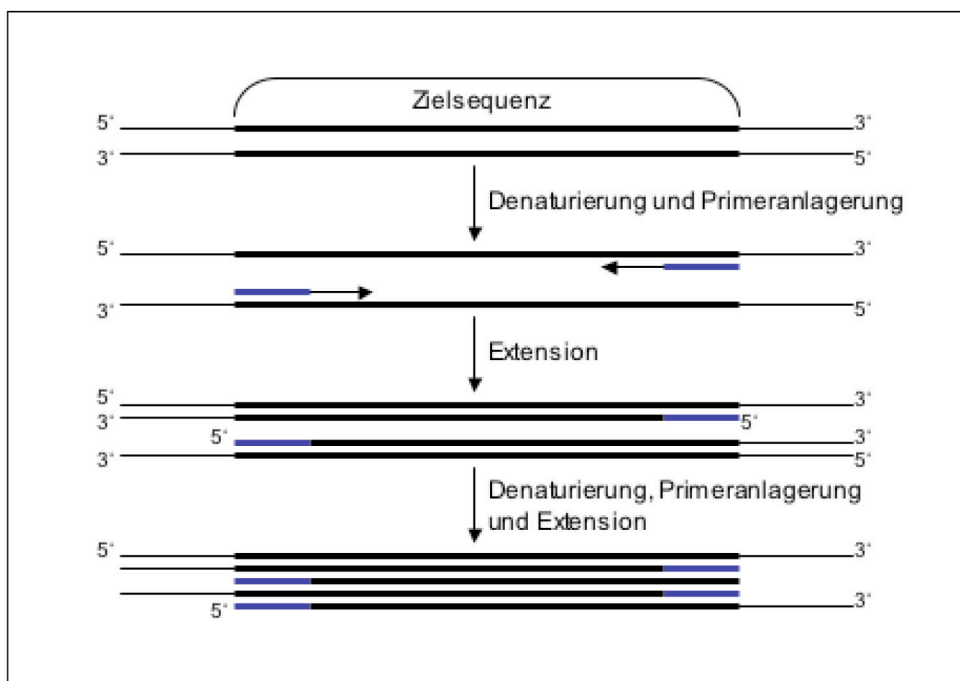


Abbildung 9: Prinzip der PCR. Die Stränge der Ziel-DNA werden durch Erhitzen aufgetrennt, damit sich spezifische Primer (blau) anlagern können. Mit Hilfe der Polymerase und in der PCR-Reaktionslösung enthaltener dNTPs entsteht ein neu synthetisierter DNA-Strang in 3'-Richtung. Im nächsten Schritt wird wieder denaturiert und dadurch eine erneute Primeranlagerung und Strangverlängerung ermöglicht. Ab dem dritten Zyklus entstehen Sequenzen, die der Länge der Zielsequenz entsprechen. Insgesamt läuft eine PCR-Reaktion über 25-42 Zyklen. Bis die Substrate aufgebraucht sind wird in jedem Zyklus die Zahl der DNA-Kopien verdoppelt.

Für die Spezifität einer PCR-Reaktion bedeutend ist hierbei die Hybridisierungstemperatur der Primer (Annealing-Temperatur). Zur annähernden Berechnung der Schmelztemperatur eignet sich die Formel  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ . Die Buchstaben A, T, G und C beziehen sich hier auf die im Primer enthaltenen Basen [nach Newton und Graham 1994].

### 3.2.2.2 Long-read PCR

Mit den herkömmlichen PCR-Polymerasen können Sequenzen von bis zu 5 kbp Länge amplifiziert werden. Eine spezielle *LA Taq*<sup>TM</sup> Polymerase ermöglicht durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität das Amplifizieren von Sequenzen bis 40 kbp Länge. Die Exonuklease entfernt falsch eingebaute Basen und erhöht damit die Genauigkeit der Polymerase (=proof-reading Polymerase).

### 3.2.2.3 PCR-Primer Design

Die Primer habe ich mit Hilfe des freeware Computerprogramms „Primers! For the Mac“ erstellt. Um ihre Spezifität zu sichern, ist bei der Konstruktion der Oligonukleotide auf verschiedene Eigenschaften der Primer zu achten:

- a) Die Oligonukleotide sollten eine Länge zwischen 20-30 Basenpaaren haben.
- b) Beide Primer einer Reaktion sollten etwa die gleiche Hybridisierungstemperatur besitzen.
- c) Alle vier Basen sollten in einem Primer gleich häufig vertreten sein.
- d) Die Primerpaare sollten an ihren 3'-Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sein. Ansonsten können sich Primerdimere, also Paare hybridisierter Primer, oder Haarnadelkurven ausbilden, welche die zuverlässige Hybridisierung der Primer mit der Matrizen-DNA verhindern.
- e) Dieselbe Base sollte nicht mehr als viermal hintereinander vorkommen.

Mit dem Programm „Amplify“ kann man die erstellten Primer auf ihre Spezifität testen. Das Programm führt dabei entlang einer vorgegebenen Sequenz eine virtuelle PCR durch. Wenn sich in Amplify für einen Primer mehrere Annealing-Orte oder Primerdimere (=Annealing der erstellten Primer untereinander) zeigten, habe ich die Primersequenzen verändert.

### 3.2.2.4 Gelelektrophorese

Um die Länge der PCR-Produkte zu kontrollieren, werden sie auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wird die negative Ladung der DNA-Moleküle bei basischem pH genutzt. In ein elektrisches Feld gebracht wandern sie in Richtung des positiven Pols. Kleine Moleküle wandern schneller als große durch das aus einem Netz von Poren bestehende Agarosegel. Als Kontrolle lässt man neben den PCR-Produkten einen Längenstandard laufen.

Dem Gel wird Ethidiumbromid beigelegt, ein Fluoreszenzfarbstoff, der erst nach Interkalation mit DNA fluoresziert. So kann man die DNA-Banden mit einem UV-Transilluminator sichtbar machen.

### 3.2.2.5 Durchführung

Ich habe die von den Patienten gewonnene mtDNA zunächst mit einer Long-read PCR amplifiziert, deren Primer spezifisch für die mtDNA sind. Dadurch habe ich vermieden, sogenannte nukleäre Pseudogene zu amplifizieren, die teilweise identisch mit Sequenzen der mtDNA sind und dadurch die Ergebnisse verfälschen können [Tourmen et al. 2002]. Eine direkte Sequenzierung des resultierenden 16237 bp langen Fragmentes mit mehreren verschachtelten (nested) Primern gelang nicht. Deshalb habe ich die mtDNA in 17 PCR-Fragmente eingeteilt und für diese das Long-PCR Produkt als Template eingesetzt. Die Primer für die Long-read PCR liegen beide im Cytochrom B-Gen (MTCYB). Die das MTCYB umfassende PCR habe ich daher direkt von der Patienten DNA gemacht.

#### 3.2.2.5.1 Long read PCR

Für die Long-read PCR habe ich das LA-PCR Kit V.2.1. von TaKaRa verwendet. Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10x LA Taq Puffer (+Mg <sup>2+</sup> )	5,0 $\mu$ l
dNTP 2,5 mM	8,0 $\mu$ l
Vorwärts-Primer (10 mM)	2,5 $\mu$ l
Rückwärts-Primer (10 mM)	2,5 $\mu$ l
LA Taq (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Aqua bidest	ad 49,0 $\mu$ l
+ Template DNA (100 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l

Ich habe die Reagenzien auf Eis pipettiert, aliquotiert und dann das Template hinzugegeben. Im Thermocycler wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

94°C 10min zur Denaturierung	
16x: 94°C	50 s
68°C	8 min 15s
16x: 94°C	50 s
68°C	8 min 15s +20s/Zyklus
62°C 1 min, danach Abkühlen auf 10°C	

Vorwärts-Primer	Lage	Rückwärts-Primer	Lage
5'-TGAGGCCAAATATC ATTCTGAGGGGC-3'	15149- 15175	5'-TTTCATCATGCGGAG ATGTTGGATGG-3'	14816- 14790

Tabelle 5: Für die Long-read PCR verwendete Oligonukleotidprimer.

### 3.2.2.5.2 PCR

Für die weiteren nested PCR-Reaktionen habe ich *Taq*-Polymerase mit dem dazugehörigen 10 x Puffer und 25 mM Magnesiumchlorid verwendet.

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10x Promega Puffer	5,0 $\mu$ l
MgCl 25 mM	7,0 $\mu$ l
dNTP 10 mM	2,0 $\mu$ l
Vorwärts-Primer (100 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Rückwärts-Primer (100 ng/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
LA- <i>Taq</i> <sup>TM</sup> (5 U/ $\mu$ l)	0,2 $\mu$ l
BSA (20 mg/ml)	0,4 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 49 $\mu$ l
+ Template DNA	1,0 $\mu$ l

Da die Zielsequenzen zum Teil eine Länge von über 1000 bp hatten, habe ich zusätzlich zur hitzestabilen *Taq*-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) eine geringe Menge proof-reading LA-*Taq*-Polymerase hinzugefügt, um die Ausbeute zu verbessern. Als Template verwendete ich das LA-PCR Produkt. für die das MTCYB-Gen betreffende PCR-Reaktion direkt die Patienten DNA.

Die Reagenzien wurden auf Eis pipettiert, dann in 200  $\mu$ l PCR-Gefäße aliquotiert und die Template-DNA hinzugegeben.

Mit einem Thermocycler wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

96°C	6 min
16x: 96°C	30 s
59°C	30 s
72°C	2 min
18x: 96°C	30 s
59°C	30 s
72°C	2 min + 10 s/Zyklus

72°C 10 min, danach sofortiges Abkühlen auf 4°C.



Fragment	Vorwärts-Primer	Lage	Rückwärts-Primer	Lage	Länge
12sRNA,Phe, Val	5'-CCCATCCTACC CAGCACACACA-3'	500 – 521	5'-CGCCTATACTT TATTTGGGTAA-3'	1750 – 1729	1251bp
16sRNA	5'-ACTTGGACGAAC CAGAGTG-3'	1590 – 1608	5'-ATGGGTACAATGA GGAGTAGGAGGT-3'	3344 – 3320	1755bp
Leu,MTND1	5'-AGGACAAGAG AAATAAGGCC-3'	3130 – 3149	5'-AAGATGGTAGA GTAGATGACGG-3'	4510 – 4489	1381bp
MTND2,Ile, Gln,Met	5'-CCAGCATTCCC CCTCAAACCTA-3'	4280 – 4301	5'-GGGGTTTTGC AGTCCTTAGC-3'	5604 – 5585	1325bp
Trp,Ala,Asn Cys,Tyr	5'-CGCTACTCCTA CCTATCTCC-3'	5470 – 5489	5'-AGAATAGTCA ACGGTCGGCG-3'	5928 – 5909	459bp
MTCo I	5'-CTCAGCCATTT TACCTCACCC-3'	5877 – 5897	5'-TTGAAAAAGTC ATGGAGGCCAT-3'	7516 – 7495	1640bp
MTCo II,Ser, Asp	5'-ATGCCCCCAC CCTACCACAC-3'	7394 – 7414	5'-GGCTCTAGAGG GGGTAGAGGGG-3'	8294 – 8273	901bp
Lys,ATPase	5'-TCGTCCTAGAA TTAATTCCC-3'	8211 – 8230	5'-TCTGAGGCTTGT AGGAGGGTA-3'	9745 – 9725	1535bp
MTCo III	5'-TCCAAGCCTAC GTTTTACAC-3'	9152 – 9172	5'-AAGGCTAGGAG GGTGTGATT-3'	10102 – 10082	951bp
Gly,Arg, MTND3	5'-GAAGCCGCCGC CTGATACTG-3'	9912 – 9931	5'-GAGGATATGAG GTGTGAGCG-3'	10555 – 10536	644bp
MTND4L+4#1	5'-GAGTGACTACA AAAAGGATT-3'	10371 – 10390	5'-GTGCGATGAG TAGGGGAAGG-3'	11258 – 11238	888bp
MTND4L+4#2, His,Ser2, Leu2	5'-CCACTATCACG AAAAAACTC-3'	11020 – 11040	5'-AGGGTTAGG GTGGTTATAGT-3'	12371 – 12352	1352bp
MTND5#1	5'-CAACATGGC TTTCTCACTTT-3'	12250 – 12270	5'-AAGCGGATGAG TAAGAAGAT-3'	13124 – 13105	875bp
MTND5#2	5'-CAACACAGC ACGGATTCAAG-3'	12828 – 12847	5'-CTATTGAGGAG TATCCTGAGGC-3'	14453 – 14432	1626bp
MTND6,Glu	5'-TCTTCTTCCCA CTCATCTAA-3'	14108 – 14128	5'-TTTCATCATGCG GCGCTGTGGATGG-3'	14816 – 14790	709bp
MTCYB	5'-CACCGACCAATG ATATGAAAAACC-3'	14695 – 14717	5'-GGAAAAAGGTTTT CATCTCCG-3'	15946 – 15926	1252bp
D-loop	5'-GCATCCGTACTAT ACTTCAC-3'	15806 – 15825	5'-GGGTGAACCTACT GGAACGG-3'	726 – 707	1489bp

Tabelle 6: Darstellung der Sequenzen und Lage der für die Amplifikation der 17 verschiedenen mtDNA-Fragmente verwendeten Oligonukleotidprimer als auch die Länge der entstandenen Fragmente.

### 3.2.2.5.3 Gelelektrophorese

Für einen 100 ml Ansatz eines 0,7%-igen Gels werden 100 ml 1x TBE Puffer und 0,7 g Agarose zum Kochen gebracht. Nach kurzem Abkühlen werden 10  $\mu$ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugegeben. Die Mischung wird nach weiterer Abkühlung auf ca. 50°C in eine Gelschlitten gegossen. Ein in den Gelschlitten ragender Kamm formt Taschen, in die nach dem Erstarren des Gels die Proben pipettiert werden. Als Laufpuffer für das Gel wurde ebenfalls 1x TBE Puffer verwendet.

5  $\mu$ l des PCR-Produktes wurden nach Zugabe von jeweils 2  $\mu$ l Ladepuffer (Blue Dextran + Ficoll) auf das Gel aufgetragen und bei 9 V/cm ca. 60 Minuten lang elektrophoriert. Als Längenstandard habe ich je nach erwarteter Länge des PCR-Produkts 100 bp- und 1000 bp-Leitern, für Long-range PCR-Produkte  $\square$ -

HindIII verwendet.

Anschließend habe ich die Fluoreszenz der ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden auf einem Transilluminator nach Anregung mit kurzwelligem UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und mit einer Kamera fotografiert.

### 3.2.3 DNA Sequenzierung

#### 3.2.3.1 Prinzip der Sequenzierung

Ich habe nach der Kettenabbruch-Didesoxy-Methode nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Durch eine Sequenzierungs-PCR werden Reihen von Oligonukleotiden produziert, deren Summe alle möglichen Fragmente eines DNA-Segmentes darstellt. Dem PCR Ansatz werden neben den Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) in einem bestimmten Verhältnis Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugegeben, die nach ihrem Einbau in die sich bildende Nukleotidkette eine weitere Ausbildung von Phosphodiesterbindungen und somit eine Verlängerung der Kette durch die DNA-Polymerase unmöglich machen. Die vier verwendeten ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (ddATP mit R6G, ddCTP mit ROX, ddGTP mit R110, ddTTP mit TAMRA), die jeweils unterschiedliche Exzitations- und Emissionsspektren besitzen.

Zur automatischen Sequenzanalyse habe ich einen automatischen Kapillarsequencer (ABI Prism 3700) verwendet. Er besitzt 16 mit flüssigem Polymer (POP6=Performance optimized Polymer 6) gefüllte Kapillaren. Entlang dieser Kapillaren wird eine Spannung angelegt und die DNA-Moleküle werden in die Kapillaren elektrophoriert. Dabei wandern kleine Moleküle schneller als große an einem Detektor vorbei, der mit einem Laserstrahl die fluoreszenzmarkierten ddNTPs zur Fluoreszenz anregt. Das Fluoreszenzlicht wird von einer Kamera registriert, in elektrische Information umgewandelt und an einen Computer weitergeleitet der die gewonnenen Daten mit einer speziellen Software in vierfarbige Elektropherogramme umwandelt. Jedem Didesoxynukleotid ist hierbei eine andere Farbe zugeordnet (A=grün, T=rot, C=blau, G=schwarz).

#### 3.2.3.2 Durchführung

Ich habe das gesamte mitochondriale Genom von ca. 16,5 kbp einmal vollständig sequenziert. Die Sequenzierprimer lagen teilweise auf dem H- und teilweise auf dem L-Strang der mtDNA. Fragliche Sequenzen habe ich zum Ausschluss von Fehlern zusätzlich auf dem jeweils komplementären Strang kontrolliert.

##### 3.2.3.2.1 Reinigung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierungsreaktion ist es von Bedeutung, dass dNTPs und

ddNTPs in einem bestimmten Verhältnis beigegeben werden. In den als Matrize verwendeten PCR Produkten sind meist noch Reaktionsprodukte enthalten, die bei der PCR-Reaktion nicht verbraucht wurden und zunächst entfernt werden müssen. Dies erfolgte mit alkalischer Phosphatase und Exonuklease I. Die Phosphatase spaltet von den dNTPs die Phosphatreste ab, wodurch sie nicht mehr reaktionsfähig sind. Exonuklease I lysiert einsträngige DNA und vernichtet so unverbrauchte Oligonukleotidpromer, lässt aber die doppelsträngigen PCR-Produkte intakt. Je 0,5  $\mu$ l Exonuklease und alkalische Phosphatase wurden auf 2  $\mu$ l PCR-Produkt plus 3  $\mu$ l Aqua bidest gegeben. Im Thermocycler wurde diese Mischung 30 Minuten bei 37° inkubiert, danach 15 Minuten auf 85°C erhitzt, um die beiden Enzyme wieder zu inaktivieren.

### 3.2.3.2.2 Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte mittels des ABI Prism<sup>®</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit Version 2.0.

Das Kit enthält einen Mix aus AmpliTaq-Polymerase FS, MgCl, dNTPs und farbmarkierten ddNTPs, sowie einen Tris-HCl Puffer (pH 9,0). Die Taq-Polymerase FS wurde speziell gentechnisch verändert und baut, im Gegensatz zur normalen Taq-Polymerase, dNTPs und die durch die Fluoreszenzmarkierung sehr großen ddNTPs gleich gut in den entstehenden DNA-Strang ein.

Der Sequenzierungs-PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

gereinigtes PCR-Produkt	6,0 $\mu$ l
(incl. Exonuklease, Alkalische Phosphatase und Aqua bidest)	
Primer (25 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
BD-Mix	2,0 $\mu$ l
BD-Buffer	1,0 $\mu$ l

Es wurde auf Eis pipettiert und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler amplifiziert:

32X: 96°C	1°/s	
96°C	10 s	
50°C	1°/s	
50°C	5 s	
60°C	1°/s	
60°C	4 min	danach sofortiges Abkühlen auf 4°C

Als Sequenzierungsprimer habe ich die oben aufgeführten PCR-Primer verwendet (Tabelle 6) und zusätzlich mit Hilfe des Programms „Primers! For the Mac“ weitere verschachtelte (nested) Primer hergestellt (Tabelle 7). So entstanden sich überlappende Sequenzen von 300 bis 500 bp Länge.

Fragment	Primer-Sequenz	Lage	Vorwärts / Rückwärts
<b>12sRNA,Phe, Val</b>	5'-CCCATCCTACCCAGCACACACA-3'	500–521	F
	5'-TCCCAGTTTGGGTCTTAGCTATTG-3'	1075–1052	R
	5'-CGGTCACACGATTAACCCAAG-3'	900–920	F
	5'-CGCCTATACTTTATTTGGGTAA-3'	1750–1729	R
<b>16sRNA</b>	5'-ACTTGGACGAACCAGAGTG-3'	1590–1608	F
	5'- AACCTTTCCTTATGAGCATGCCT-3'	2456–2434	R
	5'- AAACAGGCGGGGTAAGATTTG-3'	2499–2479	R
	5'- TCATTATTACCCTCACTGTCAACCC-3'	2404–2428	F
	5'- ACCTCGGAGCAGAACCCAA-3'	2820–2838	F
	5'- AGGACAAGAGAAATAAGGCC-3'	3130–3149	F
<b>Leu,MTND1</b>	5'- TCCTATTTATTCTAGCCACCTC-3'	3611–3632	F
	5'- AAGATGGTAGAGTAGATGACGG-3'	4510–4489	R
	5'- CCAGCATTCCCCCTCAAACCTA-3'	4280–4301	F
<b>MTND2,Ile,Gln, Met</b>	5'- ACCGCATCCATAATCCTTCTA-3'	4661–4681	F
	5'- GCCTTCTCCTCACTCTCTCAA-3'	4923–4943	F
	5'- GGGTTTTGCAGTCCTTAGCTGTT-3'	5603–5581	R
	5'- CGCTACTCCTACCTATCTCC-3'	5470–5489	F
<b>Trp,Ala,Asn, Cys,Tyr</b>	5'- AGAATAGTCAACGGTCGGCG-3'	5928–5909	R
	5'- TTATGTTGTTTATGCGGGGAA-3'	6204–6184	R
<b>MTCO I</b>	5'- CAACCTTCTAGGTAACGACCACATC-3'	6038–6062	F
	5'- CGTCCTAATCACAGCAGTCCT-3'	6464–6484	F
	5'- GTTCTTTTTTCCGGAGTAGT-3'	6702–6682	R
	5'- ATTTTGGCGTAGGTTTGGTCT-3'	7138–7118	R
	5'- TTGAAAAAGTCATGGAGGCCAT-3'	7516–7495	R
<b>MTCO II,Ser, Asp</b>	5'- ATGCCCCCACCCTACCACAC-3'	7394–7414	F
	5'- GGCTCTAGAGGGGGTAGAGGGG-3'	8294–8273	R
<b>Lys,ATPase</b>	5'- TGAGGGAGGTAGGTGGTAGTTTGT-3'	8479–8456	R

	5'- TCGTCCTAGAATTAATTCCC-3'	8211–8230	F
	5'- ACCCGCCGCAGTACTGATCAT-3'	8577–8597	F
	5' CACACCTACACCCCTTATCCC-3'	8922–8942	F
<b>MTC<sub>o</sub> III</b>	5'- TCCAAGCCTACGTTTTACAC-3'	9152–9172	F
	5'- TCTGAGGCTTGTAGGAGGGTA-3'	9745–9725	R
	5'- AAGGCTAGGAGGGTGTTGATT-3'	10102–10082	R
<b>Gly,Arg,MTND3</b>	5'- GAAGCCGCCGCCTGATACTG-3'	9912–9931	F
	5'- GAGGATATGAGGTGTGAGCG-3'	10555–10536	R
<b>MTND4L+4#1</b>	5'- GAGTGACTACAAAAAGGATT-3'	10371–10390	F
	5'- GTTTTTTTCGTGATAGTGGT-3'	11039–11020	R
	5'- TCAATCTCCAACACATATGGCCT-3'	10707–10729	F
	5'- GTGCGATGAGTAGGGGAAGG-3'	11258–11238	R
<b>MTND4L+4#2, His,Ser2,Leu2</b>	5'- CCACTATCACGAAAAAACTC-3'	11020–11040	F
	5'- TACGCCTCACACTCATTCTCA-3'	11490–11510	F
	5'- GGACTTCAAACCTACTCCC-3'	11798–11817	F
	5'- AGGGTTAGGGTGGTTATAGT-3'	12371–12352	R
<b>MTND5#1</b>	5'- GCTATCCATTGGTCTTAGGCC-3'	12283–12304	F
	5'- GCTAAGGCGAGGATGAAACC-3'	12896–12877	R
	5'- AAGCGGATGAGTAAGAAGAT-3'	13124–13105	R
	5'- TACCGCTAACAACTATTCCAAC-3'	12732–12756	F
<b>MTND5#2</b>	5'- CAACACAGCAGCCATTCAAG-3'	12828–12847	F
	5'- TCTTCTTACTCATCCGCTTCC-3'	13105–13125	F
	5'- TAGAGGGGGATTGTTGTTTGGA-3'	13790–13769	R
	5'- TCCCCACCCTTACTAACATTAACG-3'	13646–13669	F
<b>MTND6,Glu</b>	5'- TCTTCTTCCCACTCATCCTAA-3'	14108–14128	F
	5'- TAAACCCATATAACCTCCCCCAA-3'	14515–14537	F
	5'- AGGTCGATGAATGAGTGGTT-3'	14786–14767	R
<b>MTCYB</b>	5'- CACGACCAATGATATGAAAAACC-3'	14695–14717	F
	5'- CTGAGTAGCCTCCTCAGATTCAT-3'	15254–15232	R

	5'- GCAACTATAGCAACAGCCTTC-3'	15110– 15130	F
	5'- GAATGGGAGGTGATTCCTAGG-3'	15390– 15370	R
	5'- CCTCCCATTCCGATAAAATC-3'	15381– 15400	F
	5'- GGAAAAAGGTTTTTCATCTCCG-3'	15946– 15926	R
<b>D-loop</b>	5'- TAAGGGTGGGTAGGTTTGTGTTGGT-3'	16299– 16277	R
	5'- GCATCCGTACTATACTTCAC-3'	15806– 15825	F
	5'- GGATGAGGCAGGAATCAAAGAC-3'	151– 130	R
	5'- CAACCCTCAACTATCACACAT-3'	16218– 16238	F
	5'- CACCCTATTAACCACTCACGGG-3'	15–36	F
	5'-TTATGGGGTGATGTGAGCCC-3'	644– 625	R
	5'-GGGTGAACTCACTGGAACGG-3'	726– 707	R

Tabelle 7: Sequenzierungsprimer und ihre Lage auf der mtDNA. F=Forward-Primer, R=Reverse-Primer.

#### 3.2.3.2.3 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Nach der Sequenzierungs-PCR folgt die Aufreinigung der Produkte mit 75%-igem Ethanol. Dieser Schritt ist notwendig, um nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTPs zu entfernen.

Dem Cyclesequencing-Mix habe ich 26  $\mu$ l deionisiertes, autoklaviertes Wasser und 64  $\mu$ l 95%iges Ethanol zupipettiert. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur habe ich bei 1699 g 60 Minuten zentrifugiert, um das Produkt auszufällen. Nach dem Abgießen des Überstands habe ich noch einmal 100  $\mu$ l 70% Ethanol zugegeben und 10 Minuten bei 1699 g zentrifugiert. Den Überstand habe ich wieder abgegossen und das Pellet für die Gelelektrophorese weiterverarbeitet.

#### 3.2.3.2.4 Gelelektrophorese am ABI Prism 3700

Zu den aufgereinigten Produkten der Sequenzierungs-PCR habe ich jeweils 16  $\mu$ l deionisiertes Wasser gegeben. Da für die Gelelektrophorese geringe Konzentrationen von Produkt ausreichen, habe ich die Proben für die Sequenzierung noch mal 1:4 mit deionisiertem Wasser verdünnt (Sequenziervolumen 20  $\mu$ l).

#### 3.2.3.2.5 Auswertung

Die vom Sequencer ermittelten Daten werden an einen Computer weitergeleitet und mit einer Analyse-Software in Kurvendigramme umgewandelt. Die vier

Basen werden dabei in verschiedenen Farben dargestellt. Kurven, die nicht eindeutig einer Base zugeordnet werden können, werden mit N gekennzeichnet.

Die Kurvendiagramme habe ich mit einer speziellen Software (Sequence Navigator Version 1.0.1) mit der Genbanksequenz NC\_001807, die als die mtDNA-Standardsequenz festgelegt ist, verglichen.

Mit Hilfe dieses Programms kann man die zu vergleichenden Sequenzen aneinander ausrichten (Alignment). Hierbei werden ungleiche Stellen automatisch markiert. Dadurch wird die Suche nach Polymorphismen und Mutationen erheblich erleichtert.

Heteroplasmische mtDNA-Varianten werden durch die Software nicht immer sicher erkannt, da in diesem Falle zwei Kurven unterschiedlicher Höhe übereinander liegen. Es kann passieren, dass der Computer die kleinere der Kurven als Hintergrund wertet. Aus diesem Grund habe ich alle Sequenzen zusätzlich visuell ausgewertet.

### *3.2.3.3 Vergleich der Aminosäuresequenzen*

Das Programm Sequence Navigator ermöglicht die Umwandlung von DNA-Sequenzen in die entsprechenden Aminosäuren. Beim Vergleich mit der Aminosäuresequenz der Genbanksequenz NC\_001807 konnte ich bei allen Polymorphismen überprüfen, ob sie zu einem Aminosäureaustausch führen.

### **3.2.4 Genotypisierung des D310-Traktes**

Bei allen Patienten sowie der Mutter ( $M_A$ ) des Zwillingspaares A habe ich eine hypervariable Region zwischen bp 303 und 310 (D-310-Trakt) auf das Vorkommen von Heteroplasmie im Blut untersucht. Bei den Zwillingen  $A_1$  und  $A_2$  standen mir zusätzlich mehrere Neurofibrome für diese Analyse zur Verfügung.

#### *3.2.4.1 Prinzip der Genotypisierung*

Mit dem ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer können fluoreszenzmarkierte DNA Fragmente ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Durch den Vergleich mit einem der Reaktion beigefügten Standard kann die Länge jedes Fragments auf ein Basenpaare genau bestimmt werden. Die Signale werden wie bei der Sequenzierung durch einen Laser erfasst und in elektrische Signale umgewandelt. Mit Hilfe der GeneScan Analysis Software werden Kurvendiagramme erstellt. Das Integral unter jeder Kurve ist proportional zur relativen Menge der jeweiligen Fragmente in der Probe.

#### *3.2.4.2 Klonierung von PCR Produkten*

Zur Bestimmung der Längen unterschiedlicher HVR2-Regionen benötigt man

einen Standard mit definierter Länge. Um solch einen Standard zu erhalten, habe ich ein die HVR2 enthaltendes PCR-Produkt der Kontrollperson in einen Vektor kloniert. Durch die Klonierung wird es möglich, eine einzelne Gensequenz gezielt zu vervielfältigen und zu sequenzieren. Die Sequenzierung ermöglicht die direkte Abzählung der repetitiven Bassensequenzen. In diesem Falle war dies wichtig, da die HVR2 bei einem Individuum in verschiedenen Haplotypen, also heteroplasmisch vorliegen kann.

Das zu klonierende Genfragment wird in einen Vektor ligiert und das entstandene rekombinierte Molekül durch Transformation in eine Wirtszelle (hier *Escherichia coli* JM109) eingebracht. In der Wirtszelle wird der Vektor vervielfältigt. Es entsteht ein Klon, der viele identische Kopien des gewünschten Fragments enthält.

Der Vektor besitzt bestimmte Eigenschaften, die für die Klonierung wichtig sind: An einer Restriktionsschnittstelle kann das ringförmige Molekül mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease Typ II geöffnet und das DNA-Fragment durch Zugabe einer Ligase eingebaut werden. Die Schnittstelle sitzt inmitten des *lacZ'*-Gens, das für einen Teil der  $\beta$ -Galactosidase kodiert. Wird das DNA-Fragment eingebaut, kann keine  $\beta$ -Galactosidase synthetisiert werden. Durch Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), einem Substrat, das durch die  $\beta$ -Galactosidase gespalten und in ein blaues Produkt umgewandelt wird, kann man Kolonien, die das Fragment eingebaut haben (weiß), von Kolonien ohne Fragment (blau) unterscheiden.

Ausserdem enthält der Vektor ein Antibiotikaresistenzgen (hier Ampicillin) das bewirkt, dass nur ein mit diesem Vektor transformiertes Bakterium auf einem mit Ampicillin versetzten Medium wachsen kann.

#### 3.2.4.2.1 Klonierungs-PCR

Die Klonierungs-PCR habe ich nach den unter 3.2.2.5.2 genannten Bedingungen durchgeführt. Als einziger Unterschied wurde dem Ansatz keine LA-Taq zugegeben, da die Zielsequenz nur eine Länge von 412 bp hat.

Vorwärts-Primer	Lage	Rückwärts-Primer	Lage
5'-CACCCCTATTAACCA CTCACGGG-3'	15–36	5'-TTAAAAGTGCATAC CGCCAAAAG-3'	426–404

Tabelle 8: Oligonukleotidprimer für die Klonierungs-PCR und ihre Lage auf der mtDNA.

Das PCR-Produkt habe ich anschliessend in einem 1,5%-igen Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Mit dem QIAquick Gel Extraction Kit wurde das Produkt laut Protokoll der Firma aus dem Gel gelöst. So stand es in gereinigter Form für die Klonierung zur Verfügung.

#### 3.2.4.2.2 Klonierung

Zur Klonierung habe ich das pGEM<sup>®</sup>-T Vektor System von Promega verwendet.



Es enthält den pGEM<sup>®</sup>-T Vektor (50 ng/μl), Control Insert DNA (4 ng/μl), T4 DNA Ligase (100 U) und 2x Rapid Ligation Buffer.

Der pGEM<sup>®</sup>-T Vektor wird mit der Restriktionsendonuklease *EcoR* V geschnitten. An den 3'-Enden der Insertionsstelle wird jeweils einen Thymidin-Rest angehängt. Bei dieser, auch TA-Cloning genannten Methode nutzt man aus, dass die *Taq*-DNA-Polymerase bei der PCR Reaktion an das 3'-Ende des Produkts ein 3'-überhängendes Adenin anfügt. Die A- und T-Reste in Vektor und Amplifikat erleichtern die Ligation.

Für die Ligation habe ich folgenden Ansatz hergestellt und über Nacht bei 4°C inkubiert:

2x Ligasepuffer	5 μl
pGEM <sup>®</sup> -T Vektor	1 μl
T7 DNA Ligase	1 μl
Aqua bidest	2 μl
+ PCR-Produkt	1 μl

Zur Transformation habe ich 5 μl des Ligationsansatzes auf 50 μl *Escherichia coli* JM109 gegeben. Um die Vektoren in die Zellen einzubringen, wurde der Ansatz für 45 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt, danach wieder auf Eis gestellt. Damit sich die Zellen regenerieren konnten habe ich 500 μl SOC-Medium hinzugegeben und den Ansatz für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm auf den Schüttler gestellt.

Für die Platten wurden 17,5 g LB Agar in 0,5 l H<sub>2</sub>O gelöst, autoklaviert und mit Ampicillin (125 mg/ml) versetzt. Nach dem Erstarren des Agars habe ich auf jede Platte 100 μl IPTG (Isopropylthiogalactosid) und 20 μl X-Gal aufgetragen. Das IPTG ist ein Induktor der bakteriellen RNA-Polymerase und führt zur Transkription des *lacZ'*-Gens, welches für den blau/weiss-Test benötigt wird. Auf zwei Agarplatten wurden jeweils 50 μl des Transformationsansatzes ausgestrichen und diese bei 37°C über Nacht bebrütet.

Um anschliessend einzelne weiß gefärbte, also rekombinantes Plasmid enthaltende Kolonien weiter zu vermehren, habe ich sie in eine Minikultur aus 5 ml LB-Medium und Ampicillin (125 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt (225 rpm). Mit einem Minipräp Kit (QIAgen) wurde das rekombinante Plasmid schließlich laut Protokoll der Firma aufgereinigt.

Um festzustellen, ob das richtige Fragment kloniert wurde, habe ich die Plasmid-DNA als Template für eine PCR eingesetzt und das Produkt sequenziert.

#### 3.2.4.3 PCR mit fluoreszenzmarkiertem-Primer

Zur Genotypisierung wird ein PCR-Produkt erstellt, bei dem der Vorwärts-Primer mit FAM (6-carboxy-fluorescein) fluoreszenzmarkiert ist.

FAM-Primer Vorwärts	Lage	Rückwärts-Primer	Lage
5'-FAM-GCCACTTTCC ACACAGACATCATA-3'	260 – 283	5'-TTAAAAGTGCATAC CGCCAAAAG-3'	426 – 404

Tabelle 9: Oligonukleotidprimer für die Genotypisierung und ihre Lage auf der mtDNA

Die zu analysierenden Proben habe ich unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

96°C 10 min

42 x 94°C      1 min

58°C      1 min

72°C      1 min

72° 10 min      danach sofortiges Abkühlen auf 4°C

#### 3.2.4.4 Restriktion mit *HaeIII*

Die PCR-Produkte aus 3.2.3.4.5 wurden mit dem Restriktionsenzym *Hae III* (aus *Haemophilus aegypticus*) verdaut. Das Enzym erkennt die GGCC-Sequenz und der Schnitt führt zu glatten Enden. Die GGCC-Sequenz liegt unmittelbar hinter dem zu untersuchenden D310-Trakt an Position 322-325.

Der Restriktionsansatz:

*Hae III* (10000 U/ml) 1,0  $\mu$ l

10 x NEB Puffer      1,0  $\mu$ l

BSA (1  $\mu$ g/ $\mu$ l)      1,0  $\mu$ l

PCR-Produkt      6,0  $\mu$ l

wurde auf Eis pipettiert und dann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Zur Erfolgskontrolle habe ich auf einem 2,5 %igen Agarosegel 3,0  $\mu$ l des geschnittenen, 64 bp langen Produktes neben dem ungeschnittenen, 167 bp langen PCR-Produkt aufgetragen (Abbildung 11).

#### 3.2.4.5 Genescan

Zur Genotypisierung habe ich jeweils 0,1  $\mu$ l des Restriktionsproduktes zu einem Ansatz aus 9,0  $\mu$ l Formamid und 0,25  $\mu$ l ROX 500 (6-carboxy-X-rhodamin) gegeben. Das Formamid verhindert die Doppelstrangbildung, ROX 500 ist ein fluoreszenzmarkierter Längenstandard für die Genotypisierung. Unmittelbar vor der Analyse müssen die Proben bei 96°C 5 Minuten denaturiert und dann auf Eis zum Sequencer überführt werden.

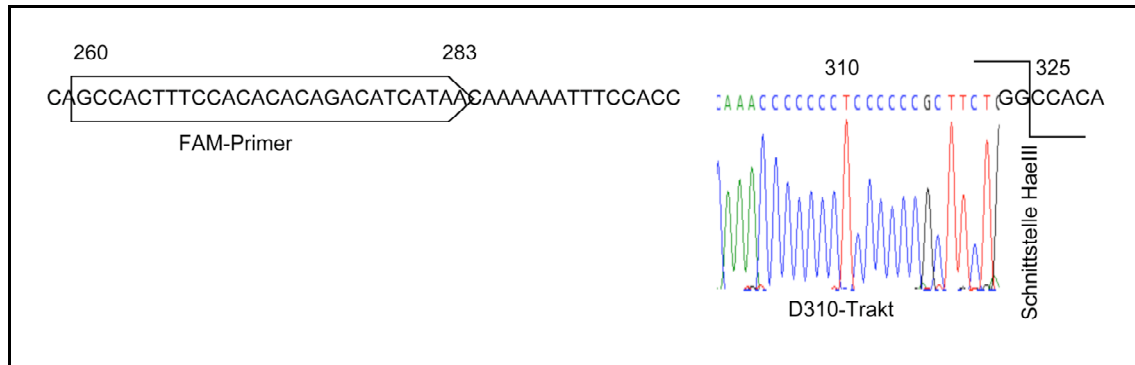


Abbildung 10: Ort der Hybridisierung des FAM-markierten Primers, der D310-Trakt (CCCCCCTCCCCC) und die Schnittstelle für HaeIII im D-loop. Der D310-Trakt ist aus einer Sequenzierungsreaktion mit der Plasmid DNA in die Abbildung eingefügt. Die für die Genotypisierung verwendete Standardsequenz hat eine Länge von 65 bp.

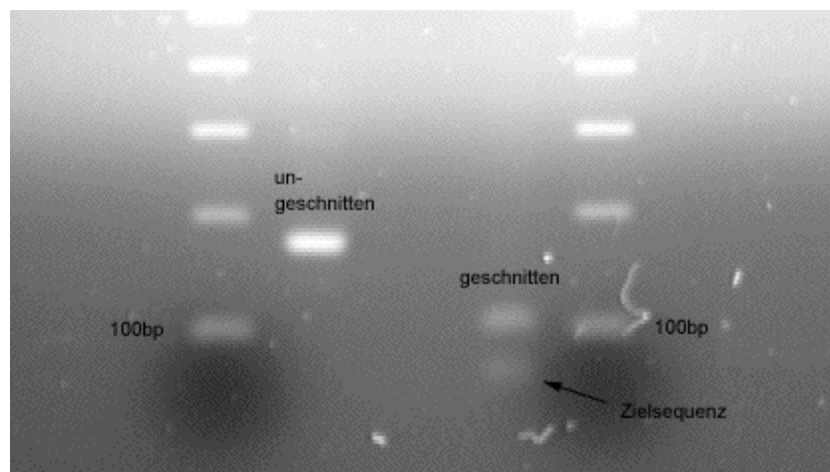


Abbildung 11: Gelelektrophorese. In der Mitte ist das PCR Produkt für die Genotypisierung vor (links) und nach (rechts) der Restriktion mit Hae III aufgetragen. Am Rand ist zu beiden Seiten ein Längenstandard aufgetragen.

#### 3.2.4.5.1 Auswertung

Die Auswertung der Genotypisierung erfolgte mit Hilfe der GeneScan Analysis Software. Es entstehen Kurvendiagramme, jede Kurve entspricht einer Längenvariante. Durch Vergleich mit dem Längenstandard ROX 500 kann man die genaue Länge in Basenpaaren bestimmen. Die Software integriert auch die Fläche unter den jeweiligen Kurven, welche die relative Menge der Variante angibt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sequenzierung des mitochondrialen Genoms

Ich habe die mtDNA vier monozygote, an Neurofibromatose Typ 1 erkrankter Zwillingspaare, sowie einer gesunden Kontrollperson jeweils einmal vollständig sequenziert.

Für die Sequenzierungs-PCR habe ich 18 PCR-Fragmente verwendet, welche die gesamte mtDNA in überlappenden Fragmenten abdecken. Sequenziert wurde mit verschachtelten Primern, von denen 37 auf dem H-, 30 auf dem L-Strang lagen. In einigen Fällen, in denen Hintergrund die Unterscheidung zwischen einem Sequenzierungsfehler oder einer echten Heteroplasmie erschwerte, habe ich die PCR-Reaktion wiederholt und bidirektional sequenziert.

#### 4.1.1 Abweichungen von der Standardsequenz

Alle Patienten und die Kontrollperson zusammengekommen habe ich insgesamt 88 Abweichungen von der Standard-Genbanksequenz NC\_001807 gefunden. 80 davon sind homoplasmische Polymorphismen, das heißt Sequenzvarianten, die sich von der Standardsequenz durch den Austausch eines Basenpaares unterscheiden. Sie lassen sich weiter untergliedern in 77 Transitionen (Austausch einer Purin- gegen eine andere Purinbase, bzw. einer Pyrimidin- gegen eine Pyrimidinbase) und drei Transversionen (Austausch einer Purin- gegen eine Pyrimidinbase).

Innerhalb der Mikrosatellitensequenzen des D-loops fand ich verschiedene Längenvarianten. Innerhalb eines CA-repeats bei nt 514 fand ich eine Insertion und eine Deletion. Ein typischer Hinweis auf das Vorliegen einer Längenheteroplasmie des D-310-Traktes ist, dass die Sequenzierung hinter dieser Region durch Überlagerung der verschiedenlangen Sequenzen nur schwer auszuwerten ist. Dies war in meinen Untersuchungen vor allem bei Zwillingspaar A der Fall. In der Sequenzierung fand ich bei allen Patienten die jeweils zum höchsten Prozentsatz vorkommende Längenvariante. Die anderen Varianten bestimmte ich mittels Genotypisierung. Abweichend von der Standardsequenz fand ich Insertionen von einem bis zu drei Cytosinresten, bzw. die Deletion eines Cytosinrestes.

#### 4.1.2 Verteilung der Sequenzvarianten innerhalb des mitochondrialen Genoms

Bei allen Patienten und der Kontrolle fand ich insgesamt 160 Sequenzvarianten.

Ungefähr ein Drittel (36%) dieser Varianten liegt im D-loop (57/160). 48% liegen innerhalb der 13 proteinkodierenden Gene (83/160), 13% in Abschnitten für die rRNA (21/160) und 3% in den Abschnitten für die t-RNAs (4/160) (Abbildung 1). Unter den proteincodierenden Genen liegen die meisten Varianten innerhalb

*MTCYB*-Gens (18/83). Keine Polymorphismen fand ich in den Genen für die ATPase8 und in 19 Genen der restlichen t-RNAs.

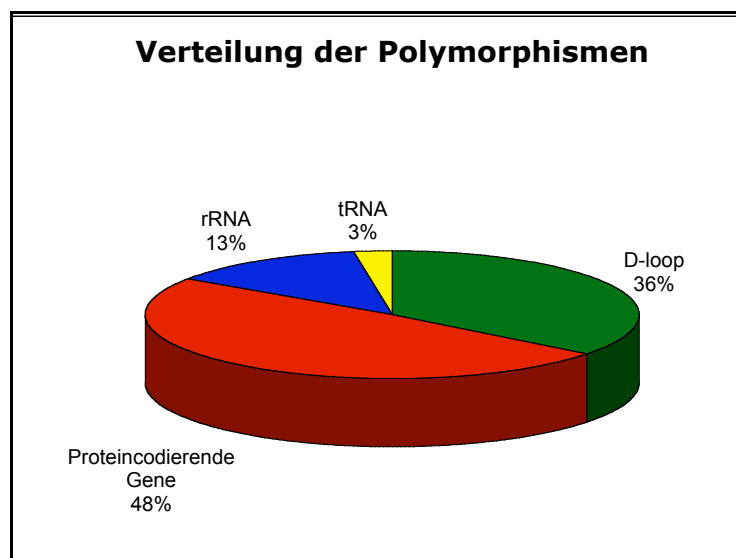


Abbildung 12: Verteilung der gefundenen Abweichungen von der Standardsequenz auf die verschiedenen Abschnitte der mtDNA.

#### 4.1.3 Vergleich der Sequenzvarianten mit der Datenbank Mitomap

Alle Sequenzvarianten mit Ausnahme der Veränderungen des D310-Traktes sind homoplasmisch. Dies bedeutet, dass an der betreffenden Stelle ein einziger Genotyp vorliegt.

Ich habe alle Varianten mit der Datenbank Mitomap (<http://www.mitomap.org>) verglichen. In dieser Datenbank sind die meisten der bisher gefundenen Polymorphismen sowie pathogenen Mutationen der mtDNA aufgeführt.

72 der gefundenen Basensubstitutionen sind in Mitomap verzeichnete Polymorphismen. Zwei davon werden im Zusammenhang mit verschiedenen Mitochondriopathien aufgeführt: 12308A>G mit Chronisch progressiver externer Ophthalmoplegie (CPEO); 13708G>A mit Leber'scher hereditärer Optikusneuropathie (LHON). An 15 Stellen findet ein Aminosäureaustausch statt. Auch alle Deletionen bzw. Insertionen innerhalb des D-loop sind in Mitomap verzeichnet.

Acht der Varianten waren zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht in Mitomap verzeichnet, bei zwei davon kommt es zum Aminosäureaustausch: an Position nt5913 im *MTCOI*-Gen, und an Position nt14002 im *MTND5*-Gen. Diese Varianten kommen jeweils nur bei einem Zwillingsspaar vor.

#### 4.1.4 Ergebnisse der einzelnen Patienten und der Kontrolle

Bei den Patienten habe ich im Durchschnitt 35,8 (33–38) Abweichungen von

der Standardsequenz gefunden, bei der Kontrollperson 17.

Sechs Varianten kommen sowohl bei allen Zwillingen, als auch bei der Kontrolle vor. Sie entsprechen alle den Sequenzabschnitten, die mittlerweile als seltene Polymorphismen bzw. Fehler in der „Oxford-Sequenz“ identifiziert wurden (263A>G, 315-316insC, 1438A>G, 3107delC, 8860A>G, 14326A>G). Sechs Varianten kommen bei allen Zwillingen, nicht aber bei der Kontrolle vor (309-310insC, 2706A>G, 4769A>G, 7028C>T, 11719G>A, 14766C>T). Sie sind bereits alle in Mitomap beschrieben.

Im Folgenden beschreibe ich die Sequenzvarianten bei den einzelnen Zwillingspaaren.

#### 4.1.4.1 Zwillingsspaar A

Bei den Zwillingen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> habe ich jeweils 34 Polymorphismen gefunden. In der Anzahl und Lage der Polymorphismen findet sich kein Unterschied zwischen den Zwillingen. Auch im Vergleich von mtDNA aus Blutleukozyten und Tumorgewebe habe ich weder bei Zwilling A<sub>1</sub> noch bei Zwilling A<sub>2</sub> einen Unterschied gefunden.

Die meisten Polymorphismen finden sich mit 44,1% (15/34) im D-loop, 35,3% (12/34) in proteinkodierenden Genen. 29 der Polymorphismen sind homoplasmische Basensubstitutionen. An acht Stellen findet ein Aminosäureaustausch statt. Zwei Polymorphismen waren zum Zeitpunkt der Auswertung nicht in Mitomap aufgeführt.

Lokus	Haplotyp	AS Austausch	Eintrag in Mitomap
<b>D-loop</b>	73A>G	-	ja
	185G>A	-	ja
	188A>G	-	ja
	228G>A	-	ja
	263A>G	-	ja
	295C>T	-	ja
	309-310insC	-	ja
	309-310insCC	-	ja
	309-310insCCC	-	ja
	315-316insC	-	ja
	462C>T	-	ja
	489T>C	-	ja
<b>12rRNA</b>	789T>C	-	<b>nein</b>
	1438A>G	-	ja
<b>16rRNA</b>	2706A>G	-	ja
	3010G>A	-	ja
	3107delC	-	ja
<b>MTND1</b>	4216T>C	Y-H	ja
<b>MTND2</b>	4769A>G	M=M	ja
<b>MTCo I</b>	7028C>T	A=A	ja
<b>ATPase6</b>	8860A>G	T-A	ja

<b>MTND3</b>	10398A>G	T–A	ja
<b>MTND4</b>	11251A>G	L=L	ja
	11719G>A	G=G	ja
<b>MTND5</b>	12612A>G	V=V	ja
	13708G>A	A–T	ja
<b>MTCYB</b>	14766C>T	I–T	ja
	14798T>C	F–L	ja
	15326A>G	T–A	ja
	15452C>A	L–I	ja
<b>Thr</b>	15947A>G	-	<b>nein</b>
<b>D-loop</b>	16069C>T	-	ja
	16126T>C	-	ja
	16519T>C	-	ja

Tabelle 10: Zwillinge A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. Analyse der mtDNA sowohl aus Blut- als auch aus Tumorzellen. Darstellung der nachgewiesenen Sequenzvarianten, deren Lage, eventueller Aminosäureaustausch und Bezug auf Eintragungen in der Mitomap-Datenbank. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet (siehe Abkürzungsverzeichnis).

#### 4.1.4.2 Zwillingsspaar B

Bei den Zwillingen B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> habe ich jeweils 33 Polymorphismen gefunden, ohne einen Unterschied zwischen ihren mtDNAs festzustellen.

Einige Sequenzen von B<sub>1</sub> schienen aufgrund des relativ hohen Hintergrundsignals sowohl bei der Sequenzierung des H- als auch des L-Stranges heteroplasmische Sequenzvarianten aufzuweisen. Ich habe die PCR-Reaktionen an den fraglichen Stellen wiederholt und dabei, trotz des Risikos der Amplifizierung nukleärer Pseudogene, statt des Long-range PCR-Produktes die aus Blut gewonnene mtDNA direkt als Matrize eingesetzt. Die PCR-Produkte habe ich dann noch einmal bidirektional sequenziert. Die Heteroplasmien ließen sich nicht bestätigen.

Bei zehn der gefundenen Basensubstitutionen kommt es zum Aminosäureaustausch. Einer davon war zum Zeitpunkt der Auswertung nicht in Mitomap verzeichnet.

Lokus	Haplotyp	AS Austausch	Eintrag in Mitomap
<b>D-loop</b>	73A>G	-	ja
	185G>A	-	ja
	228G>A	-	ja
	263A>G	-	ja
	295C>T	-	ja
	309-310delC	-	ja
	309-310insC	-	ja
	315-316insC	-	ja
	C462C>T	-	ja
	T489T>C	-	ja
<b>12rRNA</b>	1438A>G	-	ja
<b>16rRNA</b>	2706A>G	-	ja
	3010G>A	-	ja

	3107delC	-	ja
<b>MTND1</b>	4216T>C	Y-H	ja
<b>MTND2</b>	4769A>G	M=M	ja
<b>MTCo I</b>	7028C>T	A=A	ja
<b>ATPase6</b>	8860A>G	T-A	ja
<b>MTND3</b>	10398A>G	T-A	ja
<b>MTND4</b>	11251A>G	L=L	ja
	11719G>A	G=G	ja
<b>MTND5</b>	12612A>G	V=V	ja
	13708G>A	A-T	ja
	13934C>T	T-M	ja
	14002A>G	T-A	<b>nein</b>
<b>MTCYB</b>	14766C>T	I-T	ja
	14798T>C	F-L	ja
	15326A>G	T-A	ja
	15394T>C	N=N	ja
	15452C>A	L-I	ja
<b>D-loop</b>	16069C>T	-	ja
	16126T>C	-	ja
	16291C>T	-	ja

Tabelle 11: Zwillinge B1 und B2. Analyse der mtDNA aus Blutzellen. Darstellung der nachgewiesenen Sequenzvarianten, deren Lage, eventueller Aminosäureaustausch und Bezug auf Eintragungen in der Mitomap-Datenbank. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet (siehe Abkürzungsverzeichnis).

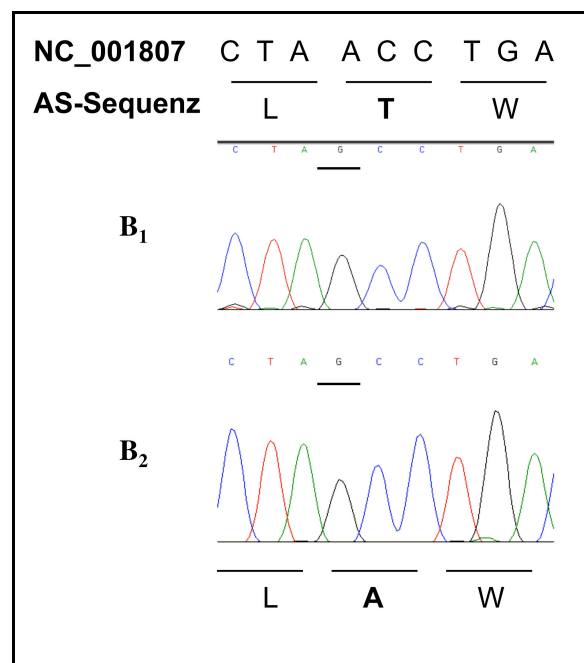


Abbildung 13: 14002A>G. Diese Transition im *MTND5*-Gen führt bei B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> zum Austausch der Aminosäure Tyrosin (T) gegen Alanin (A).



#### 4.1.4.3 Zwillingsspaar C

Bei den Zwillingen C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> habe ich jeweils 38 Sequenzvarianten gefunden. Auch hier ergab sich kein interindividueller Unterschied. An sieben Positionen kommt es zum AS-Austausch. Ein Polymorphismus war zum Zeitpunkt der Auswertung nicht in Mitomap verzeichnet.

Lokus	Haplotyp	AS Austausch	Eintrag in Mitomap
<b>D-loop</b>	73A>G	-	ja
	152T>C	-	ja
	195T>C	-	ja
	263A>G	-	ja
	309-310delC	-	ja
	309-310insC	-	ja
	315-316insC	-	ja
<b>12rRNA</b>	709G>A	-	ja
	1438A>G	-	ja
<b>16rRNA</b>	1888G>A	-	ja
	2706A>G	-	ja
	3107delC	-	ja
<b>MTND1</b>	4216T>C	Y-H	ja
<b>MTND2</b>	4769A>G	M=M	ja
	4917A>G	D-N	ja
<b>MTCo I</b>	7028C>T	A=A	ja
<b>ATPase6</b>	8697G>A	M=M	ja
	8860A>G	T-A	ja
<b>MTCo III</b>	9899T>C	H=H	ja
<b>MTND3</b>	10143G>A	G-S	ja
<b>Arginin</b>	10463T>C	-	ja
<b>MTND4</b>	11251A>G	L=L	ja
	11719G>A	G=G	ja
<b>MTND5</b>	12633C>A	S=S	ja
	13368G>A	G=G	ja
<b>MTND6</b>	14281C>T	G=G	nein
<b>MTCYB</b>	14766C>T	I-T	ja
	14905G>A	M=M	ja
	15326A>G	T-A	ja
	15452C>A	L-I	ja
	15607A>G	K=K	ja
<b>Thr</b>	15928G>A	-	ja
<b>D-loop</b>	16126T>C	-	ja
	16163A>G	-	ja
	16186C>T	-	ja
	16189T>C	-	ja
	16294C>T	-	ja
	16519T>C	-	ja

Tabelle 12: Zwillinge C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub>. Analyse der mtDNA aus Blutzellen. Darstellung der nachgewiesenen Sequenzvarianten, deren Lage, eventueller Aminosäureaustausch und Bezug auf Eintragungen in der Mitomap-Datenbank. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet (siehe Abkürzungsverzeichnis).

#### 4.1.4.4 Zwillingsspaar D

Bei den Zwillingen D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> habe ich 38 Polymorphismen gefunden, die jeweils bei beiden Patienten vorkommen. An sieben Stellen kommt es zum AS-Austausch. Vier Polymorphismen waren nicht in Mitomap aufgeführt.

Lokus	Haplotyp	AS Austausch	Eintrag in Mitomap
<b>D-loop</b>	73A>G	-	ja
	146T>C	-	ja
	195T>C	-	ja
	263A>G	-	ja
	309-310insC	-	ja
	309-310insCC	-	ja
	315-316insC	-	ja
	523-524insCA	-	ja
<b>12rRNA</b>	1189T>C	-	ja
	1438A>G	-	ja
<b>16rRNA</b>	1811A>G	-	ja
	2706A>G	-	ja
	3107delC	-	ja
<b>MTND1</b>	3480A>G	L=L	ja
<b>MTND2</b>	4769A>G	M=M	ja
<b>MTCo I</b>	5913G>A	D=N	nein
	7028C>T	A=A	ja
	7211A>A	M=M	nein
<b>ATPase6</b>	8860A>G	T=A	ja
	9055G>A	A=T	ja
<b>MTCo III</b>	9698T>C	L=L	ja
<b>MTND3</b>	10398A>G	T=A	ja
<b>MTND4L</b>	10550A>G	M=M	ja
	10646G>A	V=V	ja
<b>MTND4</b>	11299T>C	T=T	ja
	11467A>G	L=L	ja
	11719G>A	G=G	ja
<b>Leu</b>	12308A>G	-	ja
<b>MTND5</b>	12372G>A	L=L	ja
	12738T>G	A=A	nein
	13194G>A	L=L	nein
<b>MTND6</b>	14167C>T	Q=Q	ja
<b>MTCYB</b>	14766C>T	I=T	ja
	14798T>C	F=L	ja
	15326A>G	T=A	ja
<b>D-loop</b>	16224T>C	-	ja
	16311T>C	-	ja
	16519T>C	-	ja

Tabelle 13: Zwillinge D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub>. Analyse der mtDNA aus Blutzellen. Darstellung der nachgewiesenen Sequenzvarianten, deren Lage, eventueller Aminosäureaustausch und Bezug auf Eintragungen in der Mitomap-Datenbank. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet (siehe Abkürzungsverzeichnis).

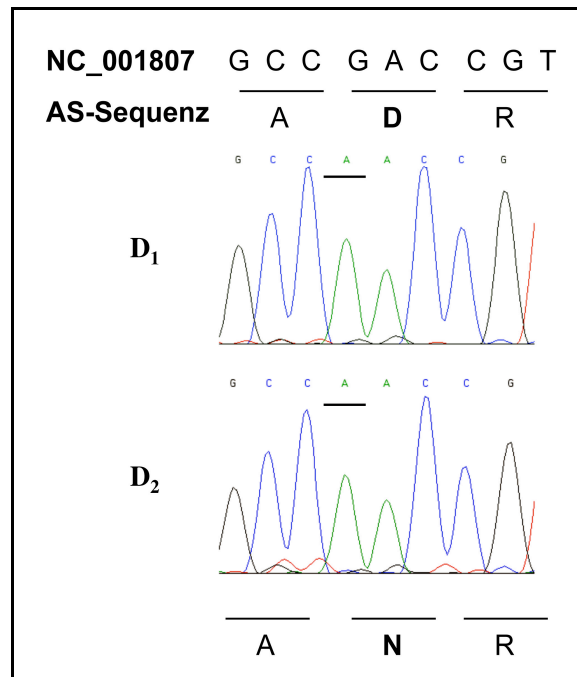


Abbildung 14: 5913G>A. Diese Transition im *MTCOI*-Gen führt bei D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> zum Austausch von Asparaginsäure (D) gegen Asparagin (N).

#### 4.1.4.5 Kontrolle

Bei der Kontrollperson fand ich 17 Sequenzvarianten, alle waren in Mitomap verzeichnet. Bei sieben kommt es zum AS-Austausch.

Lokus	Haplotyp	AS Austausch	Eintrag in Mitomap
<b>D-loop</b>	263A>G	-	ja
	315-316insC	-	ja
	522-523delCA	-	ja
<b>12rRNA</b>	1438A>G	-	ja
<b>16rRNA</b>	3107delC	-	ja
<b>MTND1</b>	3992C>T	T – M	ja
	4024A>G	T – A	ja
<b>MTND2</b>	4769A>G	M = M	ja
	5004T>C	L = L	ja
<b>MTCO II</b>	8269G>A	Ter = Ter	ja
<b>ATPase6</b>	8860A>G	T – A	ja
	9123G>A	L = L	ja
<b>MTND6</b>	14365C>T	V = V	ja
	14582A>G	V – A	ja
<b>MTCYB</b>	15326A>G	T – A	ja
<b>D-loop</b>	16104C>T	-	ja
	16260C>T	-	ja

Tabelle 14: Kontrolle. Analyse der mtDNA aus Blutzellen. Darstellung der nachgewiesenen Sequenzvarianten, deren Lage, eventueller Aminosäureaustausch und Bezug auf Eintragungen in der Mitomap-Datenbank. Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Einbuchstabencode verwendet (siehe Abkürzungsverzeichnis).

#### 4.1.5 Überprüfung der Sequenzen mit Aminosäureaustausch auf ihre evolutionäre Konservierung

Die beiden Sequenzvarianten mit Aminosäureaustausch, die nicht in der Mitomap verzeichnet waren, habe ich bezüglich ihrer evolutionären Konservierung untersucht und sie dazu mit den Aminosäuresequenzen von Maus, Huhn, Drosophila und Saccharomyces verglichen. Die Veränderung im *MTCOI*-Gen des Zwillingspaars D liegt im 5'-Bereich des Gens und betrifft die vierte von 514 Aminosäuren.

<i>Homo sapiens</i>	M	F	A	D	R	W	L	F
<i>Mus musculus</i>	M	F	I	N	R	W	L	F
<i>Gallus gallus</i>	T	F	I	N	R	W	L	F
<i>D. melanogaster</i>	-	-	-	-	Q	W	L	F
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	R	W	L	Y

Abbildung 15: 5913G>A. Der Polymorphismus führt zum Austausch einer Asparaginsäure (D) gegen Asparagin (N) an Position 4 des Proteins. Dieser Bereich erweist sich im Laufe der Evolution als variabel. Bei Maus und Huhn finden sich an Position vier jeweils ein Asparagin, während dieser Proteinabschnitt bei Drosophila und Bäckerhefe nicht vorhanden ist.

Der Austausch im *MTND5*-Gen von Zwillingspaar B liegt im 3'-Bereich des Gens und betrifft die 557. von 604 Aminosäuren. Threonin wird gegen Alanin ausgetauscht. Bei den zum Vergleich herangezogenen Spezies (*Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*) ist dieser Bereich des Proteins nicht vorhanden.

## 4.2 Hypervariable Regionen - Mikrosatellitensequenzen

### 4.2.1 HVR1

Der PolyC-Trakt zwischen nt16184-16193 war bei den einzelnen Sequenzierungsreaktionen aller Patienten unauffällig und es fanden sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer Heteroplasmie an dieser Stelle.

Bei Zwillingspaar C fand ich einen Polymorphismus (16189T>C), der laut Literaturangaben oft mit Heteroplasmie des PolyC-Traktes assoziiert sein soll [Malik et al. 2002]. Auch hier war die Sequenzierung unauffällig.

#### 4.2.2 HVR2

Die Genotypisierung der HVR2 ergab bei allen Patienten eine Heteroplasmie des D310-Traktes. Der PolyC-Trakt zwischen nt303-316 hat in der zum Vergleich herangezogenen Standardsequenz eine Länge von 14 bp. Laut der Beschreibungen dieser Region in der Literatur finden sich die Insertionen bzw. Deletionen in der ersten Hälfte des PolyC-Traktes 5' des T bei nt310. Die zweite Hälfte zwischen nt311-316 scheint mit einer Länge von sechs Cytosinresten konstant zu sein [Parella et al. 2003]. Mit der Genotypisierung konnte ich allerdings nur Veränderungen in der Gesamtlänge des Restriktionsproduktes (65 bp) feststellen. In der vorangegangenen Sequenzierung dieses Abschnitts konnte ich ausschließen, dass an anderen Stellen des für die Genotypisierung eingesetzten Produktes Insertionen oder Deletionen nachweisbar waren. Als Varianten gebe ich im Folgenden also die Veränderungen der gesamten PolyC-Sequenz zwischen nt311-316 an.

Bei der Auswertung des Längenstandards fand ich neben der eigentlichen Längensvariante zusätzliche niedrige Peaks (<13% der Gesamtfläche). Da der Standard, garantiert durch die Klonierung, nur aus einer Längensvariante bestehen kann, habe ich solche niedrigen Peaks als PCR-Artefakte gewertet und nicht mit in die Auswertung einbezogen.

##### 4.2.2.1 Zwillingspaar A und dessen Mutter $M_A$

Die Mutter  $M_A$  sowie ihre beiden Töchter  $A_1$  und  $A_2$  besitzen jeweils drei verschiedene Längensvarianten des D310-Traktes.

Die Verteilung der einzelnen Haplotypen unterscheidet sich bei Mutter und Töchtern kaum (siehe Abbildung 16). Am häufigsten ist eine Traktlänge von 16 bp mit einem Anteil von 64% im Mittelwert, dann folgen 15 bp mit 23% und schließlich 17 bp mit 13%.

Auch der Vergleich zwischen der Verteilung der Haplotypen im Blut mit der in Tumorgewebe von  $A_1$  und  $A_2$  zeigt keinen wesentlichen Unterschied (siehe Abbildung 18).

	Probe	14bp	15bp	16bp	17bp
<b>Standard</b>		100%			
<b><math>M_A</math></b>	Blut		26%	61%	13%
<b><math>A_1</math></b>	Blut		21%	67%	12%
	Tumor I		22%	65%	13%
	Tumor II		24%	64%	12%
	Tumor III		23%	65%	12%
	Tumor IV		24%	64%	12%
	Tumor V		26%	62%	12%
	Tumor VI		26%	61%	13%
	Tumor VII		25%	61%	14%
	Tumor VIII		22%	63%	15%

	Tumor IX		22%	64%	14%
	Tumor X		23%	62%	15%
	Tumor XI		26%	63%	11%
	Tumor XII		21%	63%	16%
	Tumor XIII		24%	62%	14%
	Tumor XIV		26%	62%	12%
	Tumor XV		30%	58%	12%
	Tumor XVI		25%	62%	13%
<b>A2</b>	Blut		22%	65%	13%
	Tumor		28%	61%	11%

Tabelle 15: Genescan-Analyse des D310-Traktes. Berechnung des relativen Anteils der einzelnen Haplotypen von  $M_A$ ,  $A_1$  und  $A_2$  aus der Fläche der einzelnen Peaks.

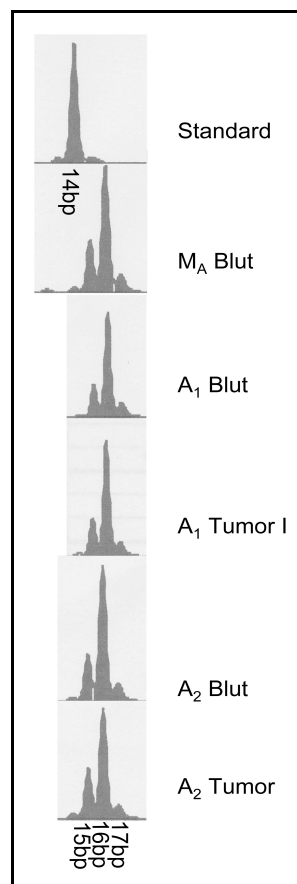


Abbildung 16: Genescan-Analyse der Zwillinge  $A_1$  und  $A_2$  (Blut und Tumor) sowie ihrer Mutter  $M_A$  (Blut). Beim Vergleich mit dem Längenstandard zeigt sich, dass die Varianten jeweils ein, zwei bzw. drei Basenpaare länger sind. Ebenso kann man die fast konstante Aufteilung der Varianten erkennen.

## 4.2.2.1.1

Vergleich der Genotypen in verschiedenen Tumoren vonA<sub>1</sub>

Die Analyse des D310-Traktes von 16 verschiedenen Neurofibromen des Zwilling A<sub>1</sub> ergibt ebenfalls keine auffallenden Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Genotypen. Die Mittelwerte für die einzelnen Genotypen liegen bei 24% für 15 bp Traktlänge (Werte schwanken zwischen 21% und 30%), 63% für 16 bp (Werte schwanken zwischen 61% und 65%) und 13% für 17 bp (Werte schwanken zwischen 11% und 15%).

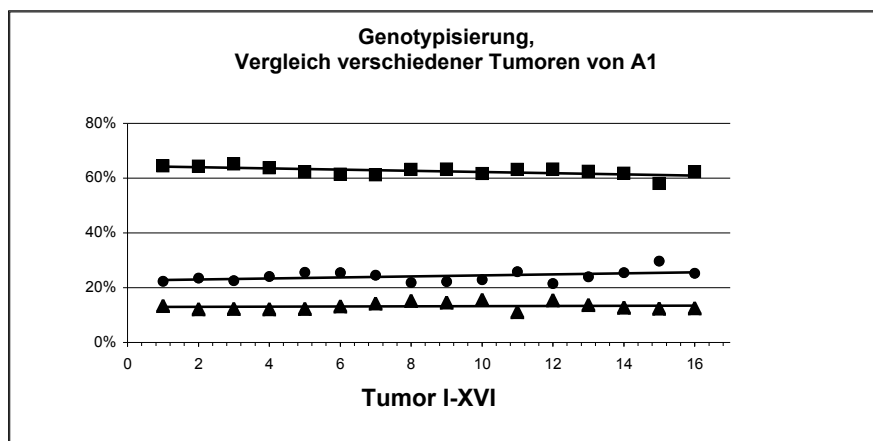


Abbildung 17: Genotypisierung des D310-Traktes. Vergleich von 16 Tumorproben von Zwilling A<sub>1</sub>. Relative Anteile und Trendlinien der drei vorkommenden Genotypen. ● 15bp Traktlänge, ■ 16bp Traktlänge, ▲ 17bp Traktlänge.

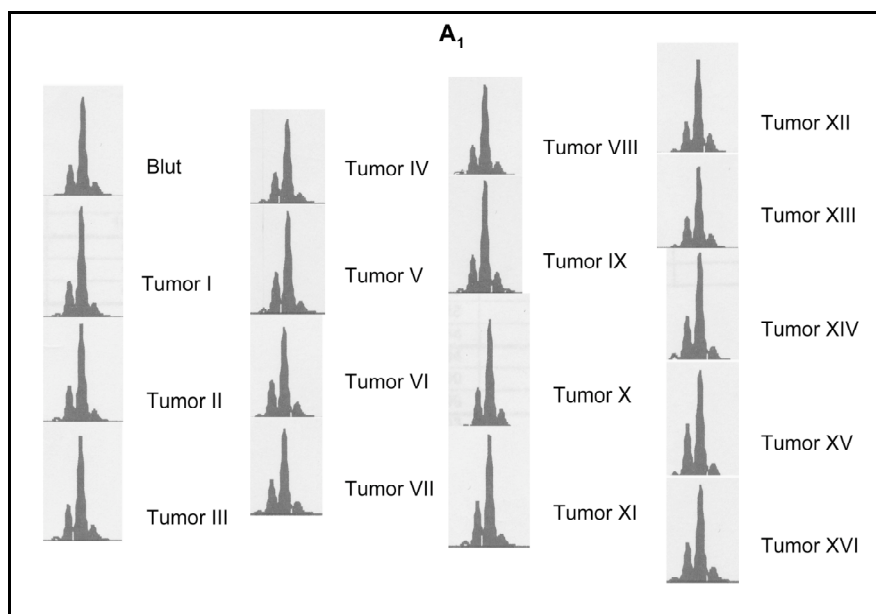


Abbildung 18: Genescan-Analyse. Vergleich des D310-Traktes von 16 verschiedenen Tumoren des Zwilling A<sub>1</sub>. Alle Tumoren besitzen die Varianten mit 15, 16 und 17 bp Traktlänge in fast konstanter Aufteilung.

#### 4.2.2.2 Zwillingsspaar B

Bei dem Zwillingsspaar B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> fand sich ebenfalls eine Heteroplasmie mit drei verschiedenen Haplotypen, die bei beiden eine ähnliche Verteilung zeigen. Am häufigsten ist die Längenvariante von 14 bp mit 84% bzw. 85%.

		13bp	14bp	15bp
<b>Standard</b>			100%	
<b>B1</b>	Blut	7%	84%	9%
<b>B2</b>	Blut	7%	85%	8%

Tabelle 16: Genescan-Analyse des D310-Traktes bei Zwillingsspaar B. Anteil der einzelnen Längenvarianten im Vergleich.

#### 4.2.2.3 Zwillingsspaar C

Auch bei C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> ergab die Genescan-Analyse drei Varianten des D310-Traktes. Die Berechnung der Fläche unterhalb des dritten Peaks von Zwilling C<sub>2</sub> mittels der GeneScan Software gelang nicht. Eine Wiederholung der PCR-Reaktion war leider nicht möglich, da von der Patientin nicht mehr genügend mtDNA vorhanden war. Der visuelle Vergleich der Genescans der beiden Patienten zeigt jedoch eine annähernd gleiche Verteilung der Längenvarianten (Abbildung 19).

		13bp	14bp	15bp
<b>Standard</b>			100%	
<b>C1</b>	Blut	7%	85%	8%

Tabelle 17: Genescan-Analyse des D310-Traktes bei Zwilling C<sub>1</sub>. Die Berechnung der Flächen bei Zwilling C<sub>2</sub> war nicht möglich.



#### 4.2.2.4 Zwillingsspaar D

D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> besitzen neben zwei weiteren Haplotypen als häufigste Variante den Haplotyp mit 15 bp Traktlänge. Auch hier zeigt sich eine annähernd gleiche Verteilung der Haplotypen.

		14bp	15bp	16bp
<b>Standard</b>		100%		
<b>D1</b>	Blut	11%	81%	8%
<b>D2</b>	Blut	12%	80%	8%

Tabelle 18: Genescan-Analyse des D310-Traktes bei Zwillingsspaar D. Anteil der einzelnen Längenvarianten im Vergleich.

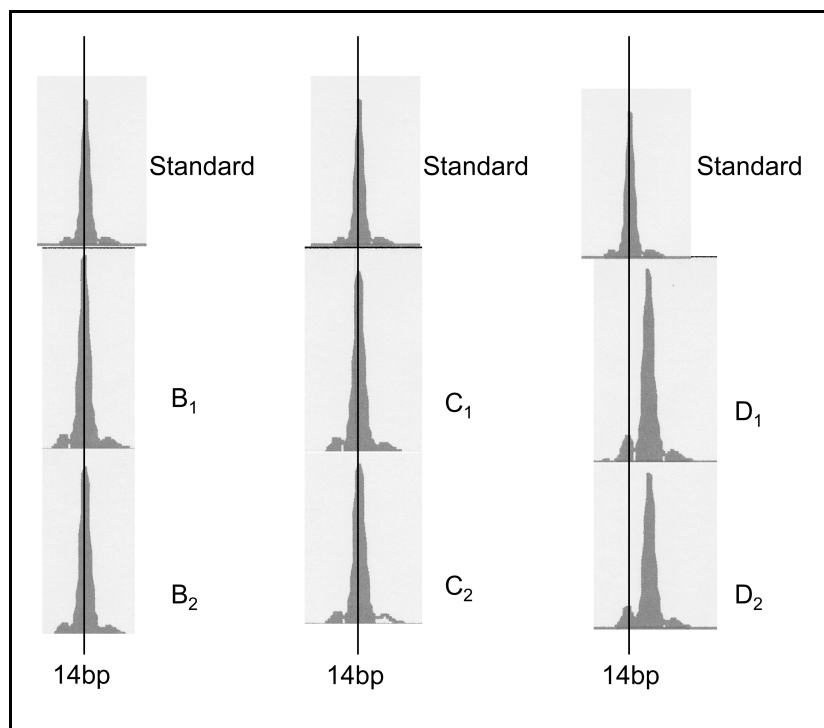


Abbildung 19: Genescan. Vergleich des D310-Traktes der Zwillinge B, C und D mit dem Längenstandard. Bei allen finden sich jeweils drei Längenvarianten. Die anteilig am stärksten vertretene Variante entspricht bei B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> sowie C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> der Länge des Standards. Bei D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> ist sie ein Basenpaar länger.

## 5 Diskussion

Ich bin in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob mitochondriale Polymorphismen die unterschiedliche phänotypische Ausprägung einer monogenen Erkrankung bei monozygoten Zwillingen beeinflussen können. Monozygote Zwillinge mit einer monogenetischen Erkrankung (hier Neurofibromatose vom Typ 1, NF1) eignen sich für solch eine Untersuchung besonders, da der genetische Hintergrund des nukleären Genoms beider Zwillinge identisch ist und Unterschiede der mtDNA, falls vorhanden, einfacher mit dem Phänotyp korreliert werden können.

Bei der Untersuchung des vollständigen mitochondrialen Genoms aus Blutzellen konnte ich keinen Unterschied zwischen den phänotypisch differenten, an NF1 erkrankten Zwillingen nachweisen.

Beim Vergleich der vollständigen mtDNA-Sequenzen fand ich bei den Zwillingen, bei denen ich auch operativ entfernte Hautneurofibrome untersuchen konnte, keine Sequenzunterschiede zwischen der aus Blutzellen und aus verschiedenen Neurofibromen extrahierten mtDNA.

Der in der Hypervariablen Region 2 (HVR2) liegende D310-Trakt liegt sowohl bei gesunden als auch bei kranken Personen oft in heteroplasmischer Form vor. In meinen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass die einzelnen Haplotypen in einem annähernd konstanten Verhältnis von der Mutter auf die Zwillinge vererbt wurden. Auch im Vergleich zwischen verschiedenen Geweben bzw. Tumoren eines Individuums änderte sich das Verhältnis der Haplotypen nicht. Innerhalb der Tumoren zeigte sich keine Tendenz zur klonalen Ausbreitung eines der Haplotypen.

### 5.1 Mitochondriale Polymorphismen und der unterschiedliche NF1-Phänotyp bei monozygoten Zwillingen

Interindividuelle Sequenzunterschiede der mtDNA könnten auf die Bedeutung mitochondrialer Polymorphismen für die phänotypische Diskordanz der Neurofibromatose Typ 1 zwischen monozygoten Zwillingen hinweisen. Hierbei verfolgte ich zunächst die Hypothese, dass bei der Mutter bereits in heteroplasmischer Form vorhandene oder in der Keimbahn entstandene Sequenzvarianten in unterschiedlichen Anteilen auf die Embryonen übertragen wurden. Ähnlich den bekannten Mitochondriopathien könnte ein Polymorphismus durch zufällige oder auch gerichtete Replikation einen Heteroplasmiegrad erreichen, bei dem er eine funktionelle Bedeutung erlangt. Eine andere Möglichkeit neben der asymmetrischen Vererbung wäre eine in einem der Zwillinge früh in der Entwicklung entstandene somatische Neumutation.

Ähnlich war der Ansatz von Kösel et al. (2000). Sie untersuchten den D-loop und das Cytochrom b Gen (*MTCYB*) vier monozygoter Zwillingspaare, von denen jeweils einer an Morbus Parkinson erkrankt war. Sie konnten keine Sequenzunterschiede in der mtDNA nachweisen. Auch bei den hier

untersuchten Patienten fand ich keine interindividuellen Unterschiede bei der Sequenzierung des kompletten mitochondrialen Genoms aus Blutzellen. Im anschließenden Vergleich der mtDNA aus Blut- und Tumorzellen sowie verschiedener Tumore untereinander fand ich ebenfalls keine Sequenzunterschiede. Somit hat nach meinen Ergebnissen das mitochondriale Genom im Falle der Neurofibromatose vom Typ 1 keinen Einfluss auf die unterschiedliche Ausprägung der Erkrankung.

Bei der Sequenzierung fand ich fast ausschließlich in den Datenbanken (Mitomap) bereits erfasste Polymorphismen. Diese Polymorphismen verhalten sich wahrscheinlich neutral und sind Ausdruck der genetischen Variabilität der mtDNA. Die in meiner Untersuchung nachweisbare Häufung der Polymorphismen im Bereich des D-loops und des *MTCYB*-Gens entspricht Regionen, die auch in großen Populationsuntersuchungen sehr variabel sind. Diese Variabilität ist so hoch, dass sie gerichtsmedizinisch zur Spureuzuordnung genutzt wird [Budowle et al. 2003].

Im Gegensatz zu den Polymorphismen der kodierenden Bereiche der mtDNA sind die meisten pathogenen mtDNA-Mutationen heteroplasmisch. Heteroplasmie konnte ich an keiner Stelle nachweisen. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass Heteroplasmie an einigen Stellen unter der Nachweisgrenze lag. Laut Bendall et al. (1996) werden heteroplasmische Punktmutationen mit einem Anteil der geringeren Variante von unter 10–20% mit den herkömmlichen Methoden (z.B. der automatischen Sequenzierung mit der Sanger-Kettenabbruchmethode) nicht entdeckt. Durch den in solchen Fällen stark überwiegenden Anteil an Wildtyp-DNA sinkt allerdings auch die Wahrscheinlichkeit, dass diese Mutationen einen Einfluss auf die geregelte Funktion der Mitochondrien haben könnten.

An zwei Positionen der mtDNA führt ein von mir nachgewiesener Basenaustausch, der nicht in Mitomap verzeichnet ist, zu einem Aminosäureaustausch. Diese Aminosäuren liegen am N-Terminus der Untereinheit I der Cytochrom C Oxidase bzw. am C-Terminus der Untereinheit 5 der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase. Beim Vergleich der menschlichen Aminosäuresequenzen mit anderen Spezies zeigt sich, dass diese beiden Aminosäuren an nicht konservierten Positionen des Proteins liegen. Laut der von Di Mauro (2000) aufgestellten Kriterien (Kapitel 1.3.3) spricht dies gegen eine funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen, es kann aber auf der anderen Seite auch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Aus meinen Untersuchungen ergibt sich kein Muster an Polymorphismen, das sich bei allen Patienten wiederholt und so im Zusammenhang mit der Erkrankung stehen könnte. Die Basenaustausche, die nicht in den Datenbanken verzeichnet waren, traten als Einzelphänomene in jeweils einem Zwillingsspaar auf und waren bei beiden Zwillingen in gleicher Form vorhanden.

## 5.2 Homoplasmische Mutationen in Tumoren

Die von mir untersuchten Zwillingsspaare unterscheiden sich unter anderem in der Zahl ihrer Neurofibrome (siehe Kapitel 2). Aus diesem Grund habe ich die

mtDNA zahlreicher Tumore eines Zwillingspaars untersucht und miteinander verglichen. Dabei konnte ich keine Unterschiede zwischen der mtDNA der Tumoren und der Blutzellen finden.

Somatische homoplasmische Mutationen, über die im Zusammenhang mit verschiedenen anderen malignen Tumorarten berichtet wurde [z.B. Polyak et al. 1998], konnte ich in den untersuchten Neurofibromen nicht nachweisen.

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen diskutiert, durch die solche Mutationen entstehen können: Mit ihrem Computermodell zur Entstehung von Homoplasmie berechneten Coller et al. (2001), dass 58% aller Tumore mindestens eine homoplasmische Punktmutation aufweisen sollten. Die experimentellen Daten ergeben jedoch sehr unterschiedliche Zahlen. Das Vorkommen und die Häufigkeit variieren stark zwischen den verschiedenen Tumorarten. So fanden Tamura et al. (1999) 4% homoplasmische Mutationen bei der Analyse des D-loops von Magenkarzinomen. Fliss et al. (2000) analysierten die mtDNA von Blasen-, Lungenkarzinomen und Tumoren im Kopf/Hals-Bereich und fanden Mutationen in 50% der Tumore. Polyak et al. (1998) entdeckten in Kolonkarzinomen in 70% homoplasmische Mutationen, Jones et al. (2001) in Pankreaskarzinomen sogar 80 %. Hier scheint ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten homoplasmischer Polymorphismen und dem Malignitätsgrad der Tumoren zu bestehen.

Coller et al. (2001) postulieren, das Entstehen solcher Mutationen sei ein Zufallsprodukt. Aufgrund vieler durchlaufener Zellteilungen werden die meisten somatischen Mutationen sowohl in normalen als auch in Tumorzellen homoplasmisch. In Tumorzellen finden mehr Zellteilungen pro Zeiteinheit statt und daher führe es dort zur Häufung homoplasmischer Mutationen.

Als weitere Möglichkeit für das Entstehen von Homoplasmie innerhalb von Tumoren vermutet man klonales Wachstum. Khrapko et al. (2003) wenden das Modell der klonalen Expansion auf verschiedene Phänomene an: Tumorentwicklung, die Ausbreitung pathogener mtDNA-Mutationen in verschiedenen Geweben und auch die Zunahme von neutralen Mutationen im Alter. Auf diese Weise versuchen sie zu erklären, wie ausgehend von einer basalen Mutationsrate die hohe Variabilität von Heteroplasmiegraden durch gleichen Mechanismus zustande kommen kann. Am Beispiel der Tumorentwicklung bedeutet dies, dass eine Zelle zum Beispiel durch Mutation von Onko- oder Tumorsuppressorgenen zur „Gründerzelle“ eines Tumors wird und sich klonal vermehrt. Enthält diese Zelle eine Mutation ihrer mitochondrialen DNA, so wird diese Mutation parallel dazu expandiert, bis sie schließlich überwiegt und im Tumorgewebe homoplasmisch wird. Auch Khrapko et al. (2003) gehen davon aus, dass dies eher zufällig als aufgrund von gezielter Selektion geschieht. In Untersuchungen einzelner Zellen konnten Nekhaeva et al. (2002a) zahlreiche klonal expandierte somatische Punktmutationen nachweisen. Auch Bodyak et al. (2001) wiesen klonale Expansion in single-cell PCR nach. Bei Entstehung und klonaler Expansion eines Tumors aus einer einzigen Zelle, wie zum Beispiel bei Lymphomen, wird eine solche Mutation im gesamten Tumorgewebe nachweisbar sein. In Neurofibromen fällt ein solcher Nachweis schwer, da es sich in der Regel um benigne Mischtumore handelt, die aus verschiedenen Gewebeanteilen

bestehen.

Ein hoher Zellumsatz und der in Tumoren erhöhte oxidative Stress durch freie Sauerstoffradikale fördern sekundär das Entstehen neuer Mutationen. Geschieht dies früh in der Tumorentwicklung können sich diese Mutationen ebenfalls auf den gesamten Tumor ausbreiten.

Entgegen dem Zufallsmodell von Collier (2001) vermuteten Polyak et al. (1998), dass die somatischen Mutationen, die sie in Kolontumoren fanden, durch einen selektiven Vorteil gegenüber dem Wildtyp-Genom Homoplasmie erlangten. Sie machten Mutationen im mitochondrialen oder aber im nukleären Genom der betreffenden Zellen dafür verantwortlich. In Zellfusionsexperimenten wurde ebenfalls mehrfach nachgewiesen, dass aus Tumorzellen stammende Mitochondrien einen Wachstumsvorteil für die Zelle bedeuten können [Shay und Ishii 1990, Polyak 1998].

Zusätzlich scheinen aber die Art des Ursprungsgewebes, die Zahl der in den Tumorzellen enthaltenen mtDNA-Moleküle und die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorzellen mit verantwortlich für das Auftreten homoplasmischer Mutationen der mtDNA zu sein. Alleine durch die Zellteilungsrate kommt es entsprechend des Modells von Collier bei schnell wachsenden Tumoren zu höheren Mutationsraten als bei langsam wachsenden Tumoren, zu denen die von mir untersuchten Neurofibrome zählen. Die Ausbreitung bzw. das Erreichen von Homoplasmie innerhalb eines Gewebes würde dann zusätzlich durch klonales Wachstum begünstigt, das ich bei den untersuchten Neurofibromen aber ebenfalls nicht nachweisen konnte.

Zu der Frage nach einem Unterschied der Mutationsrate zwischen schnell und langsam wachsenden Tumoren gibt es Untersuchungen von Kirches et al. (2001b). Im D-loop von Patienten mit Glioblastoma multiforme, einem malignen, sehr schnell wachsenden Hirntumor fanden sie im Vergleich mit mtDNA aus Blutleukozyten in 7 von 17 (41%) somatische mtDNA-Mutationen. Beim Vergleich von langsam wachsenden Grad II Astrozytomen mit Lymphozyten der Patienten fanden Kirches et al. (2002) hingegen außer einem quantitativen Shift einer Längensvariante des D310-Traktes keine Unterschiede. In einer Untersuchung der HVR2 von 247 Tumoren sowie hyper- und dysplastischen Läsionen im Vergleich mit Lymphozyten der gleichen Patienten fanden Sanchez-Cespedez et al. (2001) in 55 (22%) homoplasmische somatische Veränderungen. Bei den 100 in dieser Untersuchung eingeschlossenen Lungentumoren gab es keine Assoziation zwischen dem Vorkommen dieser Veränderungen und dem Alter und Geschlecht der Patienten sowie genetischen oder histologischen Parametern der Tumoren.

Vega et al. (2004) verglichen den Zusammenhang zwischen Veränderungen in den hypervariablen Regionen der mtDNA und der Malignität von Tumoren. Sie untersuchten Gliome in unterschiedlichen Stadien, sowie Meningeome und Schwannome. Sie fanden Veränderungen sowohl in den malignen als auch in den benignen Tumoren und die Unterschiede waren nicht signifikant. Dennoch sind die meisten Tumore, bei denen bisher Mutationen beschrieben wurden, maligne und schnell wachsend.

In meiner Untersuchung fand ich in Neurofibromen keine somatischen Mutationen. Auch ergab sich kein Hinweis auf somatische Polymorphismen, welche die Tumorentwicklung hätten beeinflussen können. Somit stehen meine Ergebnisse in Einklang mit den Untersuchungen von Coller et al. (2001), die postulieren, dass somatische Mutationen in Tumoren zufällig entstehen.

Es stellt sich nun die Frage nach der funktionellen Bedeutung solcher homoplasmischen Mutationen für die Entstehung und das Wachstum von Tumoren. Solange eine Mutation keinen Einfluss auf die Replikation oder die Funktion der Mitochondrien besitzt, sich also neutral verhält, scheint es dem Zufall überlassen, ob sie sich durchsetzt oder nicht. Jenuth et al. (1997) wiesen allerdings eine organspezifische Selektion für bzw. gegen neutrale mitochondriale Haplotypen in Mäusen nach. Es gibt Polymorphismen, die fast ausschließlich in einem Gewebe vorkommen, wie zum Beispiel 189A>G im Muskel [Wang et al. 2001]. Howell et al (2000b) wiesen die negative Selektion einer pathogenen Mutation nach. Sie untersuchten heteroplasmische LHON Patienten und konnten in einer Longitudinaluntersuchung zeigen, dass der Anteil mutierter mtDNA in Leukozyten konstant abnahm. Zum Vergleich beobachteten sie einen neutralen, ebenfalls heteroplasmisch vorkommenden Polymorphismus, der über Jahre konstant blieb. In anderen Studien wurden entgegengesetzte Befunde erhoben und die bevorzugte Replikation mutierter mtDNA Moleküle, also eine positive Selektion nachgewiesen [Yoneda et al 1992, Dunbar et al. 1995].

Veränderungen in der Zahl der Mitochondrien, ihrer Struktur, der Komponenten der Atmungskettenenzyme und der Transportsysteme wurden schon vor längerer Zeit in vielen Tumoren entdeckt [Pedersen 1978, Wilkie et al. 1983]. Augenlicht und Heerdt (2001) vermuten, dass sich unter den vielen zufällig entstandenen Mutationen, die sozusagen den „Hintergrund“ bilden, einige befinden, welche die Mitochondrienfunktion und die Zellphysiologie beeinflussen und so die Entwicklung von Tumoren fördern. Bereits 1994 untersuchten sie die Promotorregion des D-loops von Mitochondrien aus Kolonkarzinomen. Die gefundenen Polymorphismen lagen außerhalb der Promotorregion, in der Nähe der Bindungsstelle für den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM). Sie spekulierten, dass dadurch eventuell posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der mitochondrialen Genexpression beeinflusst würden.

Eine andere Hypothese stammt von Bandy und Davison (1990). Sie besagt, dass Mutationen im mitochondrialen Genom Veränderungen in der Funktion der Atmungskette und damit die erhöhte Bildung freier Sauerstoffradikale bewirken können. Diese können dann sekundär die mitochondriale und auch die nukleäre DNA, zum Beispiel Onkogene oder Tumorsuppressorgene schädigen.

Ein eindeutiger Nachweis von Mutationen, die das Tumorstadium begünstigen, konnte bisher nicht erbracht werden. Man fand keine mit einem bestimmten Tumortyp wiederholt gemeinsam auftretenden Polymorphismen. Die Regionen, in denen in Tumoren besonders häufig somatische Mutationen zu finden sind entsprechen den Regionen, die in menschlichen Populationen den höchsten Grad an Instabilität und die höchsten Mutationsraten zeigen

[Vega et al. 2004]. Einheitliche Aussagen lassen sich nur schwer treffen, da viele unterschiedliche Tumorarten untersucht wurden. Die Sequenzvarianten der von mir untersuchten Zwillingspaare liegen außerhalb der Bindungsstellen der Promotoren. Die in codierenden Regionen liegenden Polymorphismen sind bekannte, neutrale Sequenzvarianten. Auch aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass die in meiner Untersuchung nachgewiesenen Sequenzvarianten sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf das Tumorwachstum haben.

### 5.3 Die HVR2 als Marker für klonales Wachstum

Es gibt experimentelle Ansätze, Regionen wie den in der HVR2 liegenden D310-Trakt als Marker für klonales Wachstum in malignen Tumoren heranzuziehen [Ha et al. 2002].

Hauswirth und Laipis (1982) postulieren, Heteroplasmie sei lediglich ein Zwischenstadium, in dem neue Mutationen den Prozess der Segregation zur Homoplasmie durchlaufen. Nekhaeva et al. (2002a) demonstrierten diese Tendenz zum Erreichen von Homoplasmie innerhalb einzelner Zellen. Dennoch kommt gerade der D310-Trakt bei vielen Individuen in heteroplasmischer Form vor und die Längenvarianten bleiben während der gesamten Lebenszeit relativ konstant [Lagerstrom-Fermer et al. 2001]. Ha et al. (2002) vermuteten, dass es innerhalb von Tumoren eine besondere Neigung zur Expansion bzw. Deletion in dieser Region gebe. Sanchez-Cespedez et al. (2001) fanden in Tumoren eine Tendenz der D310-Trakt-Varianten zur Homoplasmie. Sie empfehlen, solche hochpolymorphen Regionen als „molekulare Uhren“ für das Entstehen von Malignität zu verwenden. Voraussetzung ist hier allerdings, dass diese Regionen bei den betreffenden Patienten in normalem Gewebe heteroplasmisch sind und, dass die im Tumor gefundene Homoplasmie kein gewebsspezifischer Polymorphismus ist. Sie konnten zeigen, dass die Patienten, die Veränderungen der HVR2 innerhalb ihrer Tumore besaßen, in den Lymphozyten heteroplasmisch waren. Eine innerhalb einer Tumorzelle enthaltene Längenvariante der HVR2 erreichte dabei im Tumor Homoplasmie. Dieser Mechanismus wäre dem Modell des Flaschenhalses ähnlich, den man während der Reifung der Oozyte vermutet: eine sehr geringe Zahl an mitochondrialen DNAs wird zur „Gründergeneration“ für die im Tumor enthaltenen mtDNAs.

Der D310-Trakt kommt in der mtDNA aus Blutzellen aller meiner Patienten in mehreren Längenvarianten vor. Haplotypen mit sieben bis neun Cytosinresten vor nt310 sind als Polymorphismen in den Datenbanken verzeichnet und scheinen in keinem Zusammenhang mit irgendeiner Art von Symptomen zu stehen. In keinem der Neurofibrome der Zwillinge A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> zeigt sich eine Tendenz zur Homoplasmie. Vielmehr fand ich in den Neurofibromen und den Blutleukozyten der Mutter M<sub>A</sub>, den Zwillingen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> annähernd die gleiche Verteilung der Längenvarianten. Sie wurden in einem konstanten Verhältnis von der Mutter auf die Zwillinge vererbt.

Die Entstehung jedes einzelnen Neurofibroms ist ein lokales Ereignis. Ein Vergleich mit monoklonalen Tumoren wie Lymphomen oder Kolonkarzinomen,

bei denen man im Tumor und allen Metastasen die gleichen Polymorphismen erwarten kann, ist dadurch nicht möglich. Geht man bei einem einzeln betrachteten Neurofibrom von klonalem Wachstum aus, so würde man erwarten, zumindest in einigen sowohl homoplasmische somatische Mutationen, als auch eine Tendenz der D310-Trakt-Varianten zur Homoplasmie zu finden. Beides konnte ich nicht nachweisen. Allerdings enthalten Neurofibrome, im Gegensatz zu Neurofibrosarkomen noch einen großen Anteil an „normal“ funktionierenden Schwann-Zellen und der Gehalt an Neurofibromin ist nur vermindert. Ich habe daher nicht nur die klonal vermehrten Schwann-Zellen, sondern Mischgewebe untersucht. Dieses Mischgewebe spiegelt das gleiche Heteroplasmiemuster wieder, wie es in den Leukozyten zu finden war.

Histologisch bestehen die Neurofibrome aus Schwann-Zellen und sind mit kollagenem Bindegewebe und fibroblastenartigen Zellen durchsetzt. Progenitorzellen für die Tumorentstehung sind die Schwann-Zellen [Kluwe et al. 1999]. Nach der Second-hit Theorie [Knudson 1971] ist neben der vererbten Mutation eine weitere Mutation des zweiten Wildtypallels für die Tumorentstehung notwendig, die zum Verlust der Heterozygotie führt. Man kann davon ausgehen, dass diese Zweitmutation in den Progenitorzellen nur einmal vorkommt und sich diese Zelle daraufhin klonal vermehrt. Second-hit Mutationen wurden hauptsächlich in malignen Tumoren von NF1-Patienten nachgewiesen [Legius et al. 1993] und nur zu geringerem Teil in Neurofibromen [Colman et al. 1995]. Daschner et al. (1997) führen dies auf den hohen Anteil an „normalen“ Zellen innerhalb der Neurofibrome zurück. Sie untersuchten neben dem Second-hit zusätzlich Inaktivierungsmuster des X-Chromosoms in Neurofibromen. Nur in einem Teil der untersuchten Tumoren fanden sich Muster die auf Klonalität der Tumorzellen hinwiesen.

In Neurofibrosarkomen lässt sich, da beide Allele mutiert sind, kaum oder kein Neurofibromin nachweisen [Basu et al. 1992, De Clue et al. 1992]. Es gibt Mausmodelle, anhand derer die Hypothese entwickelt wurde, dass bei der Entstehung maligner Nervenscheidentumore zusätzliche Mutationen im *p53*-Gen eine Rolle spielen [Cichowski et al. 1999]. Interessant wäre es zu untersuchen, ob sich in diesen malignen Tumoren der D310-Trakt in homoplasmischer Form findet. Keiner der von mir untersuchten Patienten hatte einen solchen malignen Tumor. Von dem Optikusgliom der Patientin A<sub>1</sub> stand kein Operationsmaterial zur Verfügung, ebenso wenig von den plexiformen Neurofibromen der Patienten A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub>.

Meine Untersuchungen zeigen, dass sich - zumindest bei der Untersuchung von Neurofibromen - die HVR2 nicht als Marker für klonales Wachstum eignet, wenn man die mtDNA aus dem Mischgewebe des Tumors untersucht.

## **5.4 Die phänotypische Divergenz monozygoter Zwillinge mit NF1 – andere Aspekte und Ansätze**

### **5.4.1 Modifizierende Gene**

Die Penetranz der Neurofibromatose liegt bei nahezu 100%, aber ihre Variabilität ist extrem hoch. Easton et al. (1993) veröffentlichten eine Studie, in



der sie 175 Individuen, darunter sechs monozygote Zwillingspaare mit NF1 untersuchten. Die Korrelation der Merkmale Neurofibrome und Café-au-lait-Flecken war zwischen monozygoten Zwillingen am höchsten und nahm mit abnehmendem Verwandtheitsgrad ab. Dies galt auch für weitere Merkmale wie Optikusgliome, Skoliose etc. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass neben dem mutierten *NF1*-Gen weitere modifizierende Gene einen Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung haben. Einen Einfluss der mtDNA auf die Erkrankung konnte ich nicht nachweisen.

Krone und Kehrer-Sawatzki (2001) nennen als die NF1 modifizierende Faktoren:

- den genetischen Hintergrund eines Individuums
- Proteinasen und –inhibitoren
- Komponenten der DNA-Reparaturmechanismen
- mit dem Neurofibromin interagierende Moleküle und Enzyme

Bei eineiigen Zwillingen müssten diese Modifikatoren allerdings die gleichen sein. Größere Variabilität kann man zum Beispiel bei der Modifikation von Genen bzw. Genexpressionsmustern durch epigenetische Einflüsse erwarten.

#### 5.4.2 Second hit – ein lokales Phänomen

Die Zwillingspaare in dieser Studie unterscheiden sich unter anderem in der Zahl ihrer Neurofibrome. Nach der Second-hit Theorie kommt es erst zur Entstehung eines Neurofibroms, wenn das zweite, nicht mutierte Allel des *NF1*-Gens geschädigt wird. In verschiedenen Neurofibromen eines einzelnen Patienten findet man unterschiedliche Mutationen des zweiten Allels [z.B. Serra et al. 2001, Eisenbarth et al. 2000]. Dies führte zu der Hypothese, dass jedes Neurofibrom das Ergebnis eines unabhängigen somatischen Mutationsereignisses in einer einzelnen Schwann-Zelle ist. So ließe sich erklären, wie es zu interindividuellen Unterschieden in der Zahl der Neurofibrome kommen kann, eventuell abhängig von interindividuellen Unterschieden in der somatischen Mutationsrate. Diese kann zum Beispiel durch Störungen des „mismatch repair“-Systems beeinflusst werden [Wiest et al. 2003], die zu Punktmutationen und kleinen Deletionen im Wildtyp-Allel führen. Ein anderer externer Einflussfaktor ist zum Beispiel UV-Strahlung. Entsprechend des Modells von Collier et al. (2001), können aber auch einfach zufällige Ereignisse zu Mutation und Tumorentstehung führen.

Epigenetische Faktoren können durch Veränderung der Genexpression zur Inaktivierung des Wildtyp-Allels führen. In vitro konnten Mancini et al. (1999) zeigen, dass Methylierung des *NF1*-Promotors die Bindung von Transkriptionsfaktoren hemmt. In vivo konnten Horan et al. (2000) diese Hypermethylierung der des *NF1*-Promotorregion in Neurofibromen bisher allerdings nicht nachweisen. Auch die „mismatch repair“-Gene können durch Methylierung inaktiviert werden, wie man in Untersuchungen von Kolonkarzinomzellen zeigen konnte [Jones und Laird 1999].

### 5.4.3 Neurofibromin und Mitochondrien

Roudebush et al. (1997) beschrieben die Kolokalisation von Neurofibromin und Mitochondrien. Diese Entdeckung sowie die Beschreibung von mitochondrialen Polymorphismen in Tumoren waren Anlass, in dieser Arbeit den Einfluss von Mutationen und Polymorphismen des mitochondrialen Genoms auf die phänotypische Ausprägung und das Tumorwachstum bei der Neurofibromatose zu untersuchen. Die Sequenzierung des gesamten mitochondrialen Genoms meiner Patienten ergab keinen Hinweis auf die Beeinflussung der Krankheitsschwere durch die mitochondriale DNA. Dennoch gibt es eventuell auf anderen Ebenen Interaktionen von Mitochondrien und Neurofibromin:

1. **Regulation der Apoptose:** Neurofibromin spielt durch die Inaktivierung von ras-Protoonkogenen eine Rolle als Kontrollprotein der Zellproliferation und –differenzierung [Gutman und Collins 1993]. Vogel et al. (1995) vermuteten, Neurofibromin könne als Effektor des programmierten Zelltodes in embryonalen Neuronen wirken. Sie untersuchten das gesteigerte Wachstum NF1-defizienter Neurone im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen. Diese wuchsen nur im Beisein von neurotrophen Faktoren und gingen ansonsten unter. Roudebush et al. (1997) leiteten daraus ab, das Neurofibromin könne durch Unterdrückung eines Bcl-2 vermittelten Mechanismus Apoptose induzieren. Bcl-2 Proteine befinden sich in den Membranen von Zellkern, Endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien. Sie haben durch Inhibition von Caspasen und Regulation der Membranpermeabilität der Mitochondrien anti-apoptotisches Potential. Experimentell konnte ein Zusammenwirken von Neurofibromin und Mitochondrien bei der Regulation der Apoptose bisher allerdings nicht nachgewiesen werden.

2. **Die GAP-Funktion des Neurofibromins:**

Die GAP-Region des Neurofibromins interagiert unter anderem mit dem p21ras Onkogen und führt zu dessen Inaktivierung [Martin und Viscocil 1990]. Backer und Weinstein (1986) fanden heraus, dass p21ras in seiner aktivierten Form die Phosphorylierung zweier in den Mitochondrien liegender Proteine beeinflusst ohne auf die weitere Bedeutung dieser Proteine einzugehen.

Dies sind einige Aspekte, die Ansatz weiterer Forschungsbemühungen über die Zusammenhänge zwischen Mitochondrien und Neurofibromin und mögliche Einflüsse auf Tumorwachstum bei der NF1 sein könnten. Auf der Ebene des mitochondrialen Genoms konnte ich keinen solchen Zusammenhang finden.

## 6 Zusammenfassung

**Einleitung:** Die Entdeckung somatischer homoplasmischer Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA) in Tumoren gab Anlass zu der Frage, ob Mutationen der mtDNA einen Einfluss auf Entstehen und Wachstum von Tumoren haben könnten. Die Neurofibromatose Typ 1 (von Recklinghausen) ist eine der häufigsten erblichen Tumorerkrankungen. Eineiige Zwillinge mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1), die in ihrem Genom identische Chromosomen und somit Erbinformationen aufweisen, können sich dennoch erheblich in ihrem Phänotyp unterscheiden. Da die Mitochondriengenome im Morulastadium nicht unbedingt gleichmäßig auf die Embryonen verteilt werden, könnten heteroplasmische mtDNA-Polymorphismen den Phänotyp der Neurofibromatose Typ 1 unterschiedlich beeinflussen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob es interindividuelle Unterschiede in der mtDNA-Sequenz monozygoter Zwillinge gibt, die an Neurofibromatose Typ 1 erkrankt sind. Des Weiteren habe ich nach intraindividuellen Unterschieden der mtDNA-Sequenz zwischen Blut und Tumorgewebe gesucht. Die Frage war, ob es somatische mtDNA-Mutationen gibt, die einen Einfluss auf das Entstehen der Tumore haben könnten.

Innerhalb der mtDNA gibt es hypervariable Regionen (HVR), von denen der oft in heteroplasmischer Form vorkommende D310-Trakt im D-loop als Marker für klonales Wachstum in Tumoren empfohlen wurde. Ich habe versucht, in Neurofibromen Klonalität dieser Region nachzuweisen.

**Methoden:** Ich habe die mitochondriale DNA vier monozygoter Zwillingspaare untersucht, die an Neurofibromatose Typ 1 erkrankt sind, sich jedoch im Phänotyp unterscheiden. Die DNA wurde sowohl aus Blutleukozyten als auch aus exstirpierten Neurofibromen extrahiert. Um die Amplifikation nukleärer Pseudogene zu verhindern, habe ich zunächst mit mtDNA-spezifischen Primern eine Long-range PCR durchgeführt. Nur das *Cytochrom b*-Gen wurde direkt von der Patienten DNA amplifiziert. Die Long-range PCR-Produkte habe ich in 17 überlappende PCR-Fragmente unterteilt, welche sequenziert und mit der Genbank-Standardsequenz NC\_001807 verglichen wurden. Heteroplasmische Varianten des D310-Traktes ermittelte ich mittels Genotypisierung. Mit Hilfe der GenScan Analysis Software konnte ich den jeweiligen relativen Anteil der verschiedenen Längenvarianten der einzelnen Patienten berechnen.

**Ergebnisse:** Beim Vergleich der mtDNA-Sequenzen der vier Zwillingspaare mit der Standardsequenz (Genbanksequenz NC\_001807) habe ich insgesamt 88 Abweichungen gefunden. Die meisten waren in der Datenbank Mitomap verzeichnet. 80 davon sind homoplasmische Polymorphismen, die anderen sind Insertionen oder Deletionen an hypervariablen Regionen der mtDNA. Bei den Zwillingspaaren fand ich im Schnitt 35,8 Polymorphismen (33-38). Es fanden sich keine interindividuellen Unterschiede innerhalb der einzelnen Paare. Beim Vergleich der mtDNA-Sequenzen aus Blut- mit denen aus Tumorzellen eines Zwillingspaars fand ich keinen intraindividuellen Unterschied.

Der D310-Trakt innerhalb der HVR2 kam bei allen Zwillingspaaren in heteroplasmischer Form mit jeweils drei Längenvarianten vor. Alle Längenvarianten sind bereits in der Datenbank Mitomap verzeichnet. Bei den Zwillingen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> sowie deren Mutter M<sub>A</sub> konnte ich annähernd die gleiche Verteilung der Längenvarianten in Blutzellen sowie in Neurofibromen von A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> zeigen.

**Schlussfolgerungen:** Ich konnte keinen Hinweis dafür finden, dass Veränderungen in der mtDNA die phänotypische Ausprägung einer monogenetischen Erkrankung, hier der Neurofibromatose Typ 1, beeinflussen. Innerhalb der einzelnen Zwillingspaare konnte ich keinen Unterschied in der mtDNA-Sequenz nachweisen. Die gefundenen Polymorphismen verhalten sich wahrscheinlich neutral und sind Ausdruck der genetischen Variabilität der mtDNA. Für die Ausprägung des Krankheitsbildes scheinen vielmehr andere Einflussfaktoren wie modifizierende Gene, epigenetische Faktoren, Umwelteinflüsse oder auch Zufallsereignisse von Bedeutung zu sein.

Ursprungsgewebe und Wachstumsgeschwindigkeit sind für das Entstehen somatischer mitochondrialer Polymorphismen in Tumoren von Bedeutung. Somatische Mutationen der mtDNA sind am ehesten ein Zufallsprodukt. Sie kommen aufgrund der erhöhten Zellteilungsrate in Tumorgewebe vermehrt vor. Neurofibrome sind benigne, langsam wachsende Mischtumoren. Klonalität von Tumorzellen lässt sich bei Untersuchung dieses Mischgewebes nicht nachweisen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Albertini RJ (2001) HPRT mutations in humans: biomarkers for mechanistic studies. *Mutat Res* **489**:1-16
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome *Nature* **290**:457-65
- Attardi G, Yoneda M, Chomyn A (1995) Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. *Biochim Biophys Acta* **1271**:241-8
- Augenlicht LH, Heerdt BG (2001) Mitochondria: integrators in tumorigenesis? *Nature Genet* **28**:104-5
- Backer JM, Weinstein IB (1986) p21 ras proteins and guanine nucleotides modulate the phosphorylation of 36- and 17-kilodalton mitochondria-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:6357-61
- Bandy B, Davison AJ (1990) Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radicals Biol Med* **8**:523-539
- Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J (1992) Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature* **356**:713-5
- Bauer M, Lubs H, Lubs ML (1988) Variable expressivity of neurofibromatosis-1 in identical twins. *Neurofibromatosis* **1**:323-9
- Bendall KE, Macaulay VA, Baker JR, Sykes BC (1996) Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet* **59**:1276-87
- Bodyak ND, Nekhaeva E, Wei JY, Khrapko K (2001) Quantification and sequencing of somatic deleted mtDNA in single cells: evidence for partially duplicated mtDNA in aged human tissues. *Hum Mol Genet* **10**:17-24
- Bogenhagen D, Clayton DA (1977) Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell* **11**:719-27
- Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Hubermann JA, Holt IJ (2003) Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* **278**:50961-69
- Budowle B, Allard MW, Wilson MR, Chakraborty R (2003) Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **4**:119-41

- Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D (1995) Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol* **147**:1105-11
- Carelli V, Giordano C, D'Amati, G (2003) Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends in Genetics* **19**:257-62
- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, et al. (1990) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* **62**:193-201
- Chen JZ, Gokden N, Greene GF, Green B, Kadlubar FF (2003) Simultaneous generation of multiple mitochondrial DNA mutations in human prostate tumors suggests mitochondrial hyper-mutagenesis. *Carcinogenesis* **24**:1481-87
- Cichowski K, Shih TS, Schmitt E, Santiago S, Reilly K, McLaughlin ME, Bronson RT, Jacks T (1999) Mouse models of tumor development in Neurofibromatosis Type 1. *Science* **286**:2172-76
- Clayton DA (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**:693-705
- Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG (2001) High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* **28**:147-50
- Coller HA, Bodyak ND, Khrapko K (2002) Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations: significance and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* **959**:434-47
- Colman SD, Williams A, Wallace MR (1995) Benign neurofibromas in type 1 neurofibromatosis (NF1) show somatic deletions of the NF1 gene. *Nature Genetics* **11**:90-2
- Cummins JM (2000) Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum Reprod* **15** Suppl 2:92-101
- Daschner K, Assum G, Eisenbarth I, Krone W, Hoffmeyer S, Wortmann S, Heymer B, Kehrer-Sawatzki H (1997) Clonal origin of tumor cells in a plexiform neurofibroma with LOH in NF1 intron 38 and in dermal neurofibromas without LOH of the NF1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **234**:346-50
- Davis AF, Clayton DA (1996) In situ localization of mitochondrial DNA replication in intact mammalian cells. *J Cell Biol* **135**:883-93.
- DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, Lowy DR (1992) Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell* **69**:265-73
- DiMauro S, Andreu AL (2000) Mutations in mtDNA: are we scraping the bottom of the barrel? *Brain Pathol* **10**:431-41

- Dublin S, Riccardi VM, Stephens K (1995) Methods for rapid detection of a recurrent nonsense mutation and documentation of phenotypic features in neurofibromatosis type 1 patients. *Hum Mutat* **5**:81-5
- Dunbar DR, Moonie PA, Jacobs HT, Holt IJ (1995) Different cellular backgrounds confer a marked advantage to either mutant or wild-type mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:6562-66
- Easton DF, Ponder MA, Huson SM, Ponder BA (1993) An analysis of variation in expression of neurofibromatosis (NF) type 1 (NF1): evidence for modifying genes. *Am J Hum Genet* **53**: 305-13
- Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G (2000) Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet* **66**:393-401
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D (2000) Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* **287**:2017-19.
- Friedman JM (1999) Epidemiology of neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet* **89**:1-6
- Friedman JM, Birch PH (1997) Type 1 neurofibromatosis: a descriptive analysis of the disorder in 1,728 patients. *Am J Med Genet* **70**:138-43
- Golubic M, Tanaka K, Dobrowolski S, Wood D, Tsai MH, Marshall M, Tamanoi F, Stacey DW (1991) The GTPase stimulatory activities of the neurofibromatosis type 1 and the yeast IRA2 proteins are inhibited by arachidonic acid. *Embo J* **10**:2897-903
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D (1997) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *Jama* **278**:51-7
- Gutmann DH, Collins FS (1993) The neurofibromatosis type 1 gene and its protein product, neurofibromin. *Neuron* **10**:335-43
- Ha PK, Tong BC, Westra WH, Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Zahurak M, Sidransky D, Califano JA (2002) Mitochondrial C-tract alteration in premalignant lesions of the head and neck: a marker for progression and clonal proliferation. *Clin Cancer Res* **8**:2260-65
- Habano W, Nakamura S, Sugai T (1998) Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* **17**:1931-37
- Hauswirth WW, Laipis PJ (1982) Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:4686-90
- Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**:717-19

- Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**:515-24
- Hope DG, Mulvihill JJ (1981) Malignancy in neurofibromatosis. *Adv Neurol* **29**:33-56
- Horan MP, Cooper DN, Upadhyaya M (2000) Hypermethylation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promoter is not a common event in the inactivation of the NF1 gene in NF1 specific tumors. *Hum Genet* **107**:33-39
- Horton TM, Petros JA, Heddi A, Shoffner J, Kaufman AE, Graham SD, Gramlich T, Wallace DC (2000) Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **15**:95-101
- Howell N, Chinnery PF, Ghosh SS, Fahy E, Turnbull DM (2000a) Transmission of the human mitochondrial genome. *Hum Reprod* **15** Suppl 2:235-45
- Howell N, Ghosh SS, Fahy E, Bindoff LA (2000b) Longitudinal analysis of the segregation of mtDNA mutations in heteroplasmic individuals. *J Neurol Sci* **172**:1-6
- Jansen RP, de Boer K (1998) The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* **145**:81-8
- Jansen RP (2000) Germline passage of mitochondria: quantitative considerations and possible embryological sequelae. *Hum Reprod* **15** Suppl 2:112-28
- Jenuth JP, Peterson AC, Fu K, Shoubridge EA (1996) Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA. *Nat Genet* **14**:146-51
- Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA (1997) Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* **16**:93-5
- Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH, Kern SE (2001) Detection of mitochondrial DNA mutations in pancreatic cancer offers a "mass"-ive advantage over detection of nuclear DNA mutations. *Cancer Res* **61**:1299-304
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* **21**:163-67
- Khrapko K, Nekhaeva E, Kraytsberg Y, Kunz W (2003) Clonal expansions of mitochondrial genomes: implications for in vivo mutational spectra. *Mutat Res* **522**:13-9
- Kirches E, Michael M, Warich-Kirches M, Schneider T, Weis S, Krause G, Mawrin C, Dietzmann K (2001a) Heterogeneous tissue distribution of a mitochondrial DNA polymorphism in heteroplasmic subjects without mitochondrial disorders. *J Med Genet* **38**:312-17
- Kirches E, Krause G, Warich-Kirches M, Weis S, Schneider T, Meyer-Puttlitz B, Mawrin C, Dietzmann K (2001b) High frequency of mitochondrial DNA



- mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. *Int J Cancer* **93**:534-38
- Kirches E, Krause G, Weis S, Mawrin C, Dietzmann K (2002) Comparison between mitochondrial DNA sequences in low grade astrocytomas and corresponding blood samples. *Mol Pathol* **55**:204-6
- Klose A, Ahmadian MR, Schuelke M, Scheffzek K, Hoffmeyer S, Gewies A, Schmitz F, Kaufmann D, Peters H, Wittinghofer A, Nurnberg P (1998) Selective disactivation of neurofibromin GAP activity in neurofibromatosis type 1. *Hum Mol Genet* **7**:1261-68
- Kluwe L, Friedrich R, Mautner VF (1999) Loss of NF1 allele in Schwann cells but not in fibroblasts derived from an NF1-associated neurofibroma. *Genes Chromosomes Cancer* **24**:283-5
- Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**:820-23
- Koehler CM, Lindberg GL, Brown DR, Beitz DC, Freeman AE, Mayfield JE, Myers AM (1991) Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation. *Genetics* **129**:247-55
- Kosel S, Grasbon-Frodl EM, Hagenah JM, Graeber MB, Vieregge P (2000) Parkinson disease: analysis of mitochondrial DNA in monozygotic twins. *Neurogenetics* **2**:227-30
- Krone W, Kehrer-Sawatzki H (2001) Neurofibromatose Typ 1 in Ganten D und Ruckpaul K (Hrsg.) Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen. *Springer-Verlag* 90-163
- Kunkel TA, Loeb LA (1981) Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* **213**:765-67
- Lagerstrom-Fermer M, Olsson C, Forsgren L, Syvanen AC (2001) Heteroplasmy of the human mtDNA control region remains constant during life. *Am J Hum Genet* **68**:1299-301
- Larsson NG, Barsh GS, Clayton DA (1997) Structure and chromosomal localization of the mouse mitochondrial transcription factor A gene (Tfam). *Mamm Genome* **8**:139-40
- Legius E, Marchuk D, Collins FS, Glover TW (1993) Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumour suppressor gene hypothesis. *Nature Genetics* **3**:122-26
- Liu VW, Yang HJ, Wang Y, Tsang PC, Cheung AN, Chiu PM, Ng TY, Wong LC, Nagley P, Ngan HY (2003) High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br J of Cancer* **89**:697-701
- Listernick R, Louis DN, Packer RJ, Gutmann DH (1997) Optic pathway gliomas in children with neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Optic Pathway Glioma Task Force. *Ann Neurol* **41**:143-49
- Malik S, Sudoyo H, Pramoonjago P, Suryadi H, Sukarna T, Njunting M,

- Sahiratmadja E, Marzuki S (2002) Nuclear mitochondrial interplay in the modulation of the homopolymeric tract length heteroplasmy in the control (D-loop) region of the mitochondrial DNA. *Hum Genet* **110**:402-11
- Mancini DN, Singh SM, Archer TK, Rodenhiser DI (1999) Site-specific DNA methylation in the neurofibromatosis (NF1) promoter interferes with binding of CREB and SP1 transcription factors. *Oncogene* **18**:4108-19
- Margulis L (1975) Symbiotic theory of the origin of eucaryotic organelles; criteria for proof. *Exp Soc Biol* **29**:21-38
- Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, et al. (1990) The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* **63**:843-49
- Miller M, Hall JG (1978) Possible maternal effect on severity of neurofibromatosis. *Lancet* **2**:1071-73
- Monnat RJ, Jr., Loeb LA (1985) Nucleotide sequence preservation of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:2895-99
- Muller HJ (1964) The Relation of Recombination to Mutational Advance. *Mutat Res* **106**:2-9
- Mullis KB and Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50
- Nass S, Nass MM (1963) Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. II. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *J Cell Biol* **19**:613-29
- Nekhaeva E, Kraytsberg Y, Khrapko K (2002a) mtLOH (mitochondrial loss of heteroplasmy), aging, and 'surrogate self'. *Mech Ageing Dev* **123**:891-98
- Nekhaeva E, Bodyak ND, Kraytsberg Y, McGrath SB, Van Orsouw NJ, Pluzhnikov A, Wei JY, Vijg J, Khrapko K (2002b) Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5521-26
- Newton CR, Graham A (1994) PCR, 2. Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag.
- NIH (1988) Neurofibromatosis. Conference statement. National Institutes of Health Consensus Development Conference. *Arch Neurol* **45**:575-78
- North KN, Riccardi V, Samango-Sprouse C (1997) Cognitive function and academic performance in neurofibromatosis 1: consensus statement from the NF1 Cognitive Disorders Task Force. *Neurology* **48**:1121-27
- Oberley LW, Buettner GR (1979) Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* **39**:1141-49
- Parrella P, Seripa D, Matera MG, Rabitti C, Rinaldi M, Mazzarelli P, Gravina C, Gallucci M, Altomare V, Flammia G, Casalino B, Benedetti-Panici PL, Fazio VM (2003) Mutations of the D310 mitochondrial mononucleotide

- repeat in primary tumors and cytological specimens. *Cancer Lett* **190**:73-77
- Pedersen PL (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* **22**:190-274
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* **20**:291-93
- Rasmussen SA, Friedman JM (2000) NF1 gene and neurofibromatosis 1. *Am J Epidemiol* **151**:33-40
- Recklinghausen F (1882) Über die multiplen Fibrome der Haut und ihre Beziehung zu den multiplen Neuomen. Berlin, Hirschwald
- Riccardi VM (2000) Histogenesis control genes and neurofibromatosis 1. *Eur J Pediatr* **159**:475-76
- Roudebush M, Slabe T, Sundaram V, Hoppel CL, Golubic M, Stacey DW (1997) Neurofibromin colocalizes with mitochondria in cultured cells. *Exp Cell Res* **236**:161-72
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, Cohen D, Xiao Y, Esteller M, Jeronimo C, Jordan RC, Nicol T, Koch WM, Schoenberg M, Mazzarelli P, Fazio VM, Sidransky D (2001) Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* **61**:7015-19
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-67
- Schuelke M, Bakker M, Stoltenburg G, Sperner J, von Moers A (1998) Epilepsia partialis continua associated with a homoplasmic mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) mutation. *Ann Neurol* **44**:700-4
- Schwartz M, Vissing J (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* **347**:576-80
- Serra E, Ars E, Ravella A, Sánchez A, Puig S, Rosenbaum T, Estivil X, Lázaro C (2001) Somatic NF1 mutational spectrum in benign neurofibromas: mRNA splice defects are common among point mutations. *Hum Genet* **108**:416-29
- Shay JW, Ishii S (1990) Unexpected nonrandom mitochondrial DNA segregation in human cell hybrids. *Anticancer Res* **10**:279-84
- Stephens K, Kayes L, Riccardi VM, Rising M, Sybert VP, Pagon RA (1992) Preferential mutation of the neurofibromatosis type 1 gene in paternally derived chromosomes. *Hum Genet* **88**:279-82
- Tamura G, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Sakata K, Endoh Y and Motoyama T (1999) Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumors of Japanese patients. *Eur J Cancer* **35**:316-319

- Taylor RW, Barron MJ, Borthwick GM, Gospel A, Chinnery PF, Samuels DC, Taylor GA, Plusa SM, Needham SJ, Greaves LC, Kirkwood TB, Turnbull DM (2003) Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest* **112**:1351-60
- Tourmen Y, Baris O, Dessen P, Jacques C, Malthiery Y, Reynier P (2002) Structure and chromosomal distribution of human mitochondrial pseudogenes. *Genomics* **80**:71-7
- Upadhyaya M, Cheryson A, Broadhead W, Fryer A, Shaw DJ, Huson S, Wallace MR, Andersen LB, Marchuk DA, Viskochil D, et al. (1990) A 90 kb DNA deletion associated with neurofibromatosis type 1. *J Med Genet* **27**:738-41
- Upadhyaya M, Ruggieri M, Maynard J, Osborn M, Hartog C, Mudd S, Penttinen M, Cordeiro I, Ponder M, Ponder BA, Krawczak M, Cooper DN (1998) Gross deletions of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene are predominantly of maternal origin and commonly associated with a learning disability, dysmorphic features and developmental delay. *Hum Genet* **102**:591-97
- Vega A, Salas A, Gamborino E, Sobrido MJ, Macaulay V, Carracedo A (2004) mtDNA mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of mtDNA in populations. *Oncogene* **23**:1314-20
- Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, et al. (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* **62**:187-92
- Vogel KS, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG and Parada LF (1995) Loss of neurofibromin results in neurotrophin-independent survival of embryonic sensory and sympathetic neurons. *Cell* **82**:733-42
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, 2nd, Nikoskelainen EK (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* **242**:1427-30
- Wallace MR, Marchuk DA, Anderson LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, Brownstein BH, Collins FS (1990) Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* **249**:181-86
- Wallace DC (1995) 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* **57**:201-23
- Wang Y, Michikawa Y, Mallidis C, Bai Y, Woodhouse L, Yarasheski KE, Miller CA, Askanas V, Engel WK, Bhasin S, Attardi G (2001) Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4022-27
- Wiest V, Eisenbarth I, Schmegner C, Krone W, Assum G (2003) Somatic NF1 Mutation Spectra in a Family With Neurofibromatosis Type 1: Toward a

Theory of Genetic Modifiers. *Hum Mutat* **22**:423-27

Wilkie D, Evans IH, Egilsson V, Diala ES, Collier D (1983) Mitochondria, cell surface, and carcinogenesis. *Int Rev Cytol Suppl* **15**:157-89

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, et al. (1990) The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* **62**:599-608

Yoneda M, Chomyn A, Martinuzzi A, Hurko O, Attardi G (1992) Marked replicative advantage of human mtDNA carrying a point mutation that causes the MELAS encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:11164-68

Zöller M, Rembeck B, Akesson HO (1997) Life expectancy, mortality and prognostic factors in neurofibromatosis type 1: a twelve-year follow-up of an epidemiological study in Göteborg, Sweden. *Acta Derm Venereol* **75**:136-40

## Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation unter dem Titel

**„Untersuchung des Einflusses mitochondrialer Polymorphismen auf die phänotypische Ausprägung der Neurofibromatose Typ 1 bei monozygoten Zwillingen“**

von mir, Anne Katrin Detjen, selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde.

Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzen Hilfsmittel sowie die Literatur wurden vollständig angegeben.

.....  
Anne Detjen